



**“FARMACOGENÓMICA DE LA AZATIOPRINA EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL”**

William Martín Zabala Fernández
Facultad de Medicina
Universidad de Santiago de Compostela
Marzo, 2011

ISBN 978-84-9887-773-1 (Edición digital PDF)



El Dr. ÁNGEL CARRACEDO ÁLVAREZ, Catedrático de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela, y el Dr. FRANCISCO BARROS, adjunto de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.

CERTIFICAN

Que la presente memoria, con título: **“FARMACOGENÓMICA DE LA AZATIOPRINA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL”**, que presenta el licenciado en Medicina WILLIAM MARTIN ZABALA FERNÁNDEZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándolo en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándolo para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela, a 11 de marzo de 2011.

Fdo. Prof. Ángel Carracedo Álvarez

Fdo. Dr. Francisco Barros

Dedicatoria

A mi familia y amigos, quienes me han acompañado siempre en el largo caminar del autoconocimiento, desarrollo personal y profesional.

Agradecimientos

Al llegar a este momento resulta un poco más difícil que la misma escritura de la tesis, son tantas las personas, situaciones e incluso organizaciones que es un riesgo aventurarse a nombrarlos sin dejar a alguien por fuera. Si lo hago entenderán que no es intencional.

Al Ser maravilloso dador de vida, alegrías, oportunidades, esperanza y amor, Dios.

A mi familia, mis padres, hermanos y sobrinos quienes desde la distancia me acompañaron siempre con sus llamadas, oraciones y recuerdos fueron fuente inagotable de valor y compañía.

Al Dr. Ángel Carracedo, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y apoyo en todo momento, infinitamente agradecido por colaborar en mi formación profesional.

Al Dr. Francisco Barros, igualmente por brindarme la confianza y el apoyo al integrarme en el grupo de Farmacogenética, por ser fuente inspiradora de conocimientos, consejero y asesor, agradezco siempre tus comentarios y especialmente la paciencia de ser tutor a distancia.

Al Dr. Manuel Barreiro por el apoyo, el estímulo, ayuda y buenos consejos. Por ser el contacto con el grupo EIGA colaborador en el remisión de los pacientes de esta investigación.

A mi grupo de trabajo en Venezuela, compañeros y amigos que creyeron en mi desde siempre, me acompañaron y animaron a cumplir esta nueva meta; Tatiana, Lisbeth, Prof. Tania, Lennie, Erika, Mariana, Gaby, MAS, José Miguel y Dianita, y en esta última etapa a Yanira y karile, por entender mis ausencias y darme el estímulo de culminar.

A mis amigos en Venezuela; Rita, Tatiana, Elvilena, Patricia, Néstor, Ángel, Jenny, Nonna, Edwin, Enrique, simplemente por estar ahí, por entenderme y ser apoyo en todo sentido, estímulo constante, recuerdo ferviente del amor incondicional.

A mis amigos gallegos, compañeros de estudios, de laboratorio (de arriba y abajo): Pablo, Alejandro, Ceres, Nuria, Ana Blanco, Marta C, Laura, Marta S, Pili, María C, María D, Carla, Ana F, Marigli, Marcos, Yarimar y Ezequiel. Como siempre he de hacer mención especial a la hora del café y las tortillas; sitios de encuentro y espacio de charlas amenas que hacían cada día más llevadero para mi desde la distancia. Chicos el haberme brindado desde el primer día su apoyo, amistad, consejos, compañía y cariño fue la pieza fundamental para llegar hasta este momento. A lili, mi amiguita, por siempre estar ahí, en todo momento, desde al lado de mi habitación o del otro lado del mundo.

Igualmente a los anexos al grupo, de suma importancia, a Lucia y las chicas del servicio de oncología, a mi hermano Gallego Juan Ceres, colega de cine y series, al amigo de todos Manu, un abrazo enorme y por siempre agradecido. A Erola, un abrazo amiga, siempre te recuerdo. Mención honorífica a Raquel, GRACIAS en mayúsculas por tu paciencia, apoyo y siempre disposición a colaborar conmigo en este proceso.

A los compañeros de la Fundación, de quienes siempre recibí mucho cariño, apoyo y ayuda en todos los momentos requeridos, a los Investigadores, personal administrativo y en particular a las chicas de extracción (Ana, Clara, Luli, Celsa, Rocio, Marga, Olga, Eva, las chicas del CEGEN, Xavi, Noa).

A mis amigos Venezolanos en España, Carlitos, Juan Pedro, Ariatna, Armando, Jairito, Yosima, Luz M, y Coralee, un pequeño espacio de mi tierra en el viejo mundo.

A Galicia, tierra bendita, sembraste en mi la morriña gallega, hoy entiendo lo importante que fuiste en mi vida.

A los hermanos y hermanas biodanzantes de Venezuela y del mundo, por el apoyo, amor, alegría, ternura y tantas cosas buenas que han traído a mi vida.

A los organismos financiadores de esta investigación y mi formación, a la Universidad del Zulia y al Gobierno de la Rep. Bol. de Venezuela, al Ministerio de Ciencia e Innovación (Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III, PI071032), y a la Fundación Barrie de la Maza (Programa DIANA).

Al grupo ENEIDA, por facilitar al grupo de réplica utilizado en esta investigación.

A todos los que no he nombrado en este apartado pero que siempre han estado ahí, infinitas gracias.....

William, Billy, Winchi

ABREVIATURAS

- 6-TGNs: Nucleótidos de tioguanina
- μL : Microlitros
- μM : Micromolar
- $^{\circ}\text{C}$ Grados centígrados
- AB: Applied Biosystems
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AFX: Affymetrix
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNi: ARN de interferencia
- AZA: Azatioprina
- bp: Base pairs (pares de bases)
- CeGen: Centro Nacional de Genotipado
- dNTP: Dinucleótidos trifosfato
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EII: Enfermedad inflamatoria inestestinal
- ENEIDA: Estudio Nacional en Enfermedad Inflamatoria Intestinal sobre Determinantes Genéticos y Ambientales
- FPGMX: Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica
- Gap: sitio vacío
- Kb: Kilobase
- kDa: kilodaltons
- MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry
- min: Minutos
- MIP: Molecular Inversion Probe (sonda de inversión molecular)
- MMP: metaloproteasas de matriz
- mM: Milimolar
- MgCl_2 : Cloruro de Magnesio
- ND: No determinado
- ng/mL: Nanogramos/mililitro
- PCR: Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- Rpm: Revoluciones por minuto
- rs: Reference SNP identification (secuencia de referencia de identificación)
- SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase
- Seg: Segundos
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotide simple)
- TE1X buffer Tris-EDTA
- T_m : Melting temperature (temperatura de fusión)
- U: Unidades de actividad enzimática
- wt: alelo normal o salvaje
- ZFP: proteína *zinc finger* (ZFP)

Índice de Contenido

| | |
|---|----|
| I. Introducción | 1 |
| 1. ¿De dónde viene y por qué la Farmacogenética? | 3 |
| 2. Evolución de la Farmacogenética..... | 4 |
| 3. Definición de Enfermedad inflamatoria Intestinal..... | 6 |
| 3.1 Manifestaciones clínicas de la EII..... | 6 |
| 3.2 Epidemiología de la EII | 7 |
| 3.3 Etiología y patogenia de le EII | 7 |
| 3.4 Genes y predisposición | 8 |
| 3.5 Tratamiento de la EII..... | 12 |
| 4. Farmacogenética del tratamiento con tiopurinas | 16 |
| 5. Estudios de Genoma Completos y Farmacogenética..... | 20 |
| II. Objetivos | 23 |
| Objetivo general:..... | 25 |
| Objetivos específicos:..... | 25 |
| III. Material y Métodos..... | 27 |
| 1. Pacientes y criterios de inclusión | 29 |
| 2. Aspectos éticos del estudio..... | 30 |
| 3. Diseño del estudio..... | 30 |
| 3.1 Dosis y evaluación de la respuesta clínica al tratamiento | 31 |
| 3.2 Criterios Clínicos para la definición de los EA | 31 |
| 4. Extracción del ADN..... | 32 |
| 5. Genotipados | 32 |
| 5.1 Affymetrix GeneChip Human 20K cSNP | 32 |
| 5.2 SNaPshot de los genes <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> | 42 |
| 5.3 MALDI-TOF-MS..... | 47 |
| 6. Análisis estadístico | 51 |
| 6.1 Análisis estadístico en el estudio del Genoma Completo | 51 |
| 6.2 Análisis estadístico en el estudio de los genes <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> | 52 |
| 6.3 Análisis de asociación en el estudio del GWAS ajustado por covariables | 52 |
| 6.4 Análisis Estadístico en el estudio de la Replica: | 52 |
| IV. Resultados..... | 53 |
| A. Estudio de asociación de genoma completo. | 55 |

| | |
|--|-----|
| 1. La población de estudio..... | 55 |
| 2. Control de Calidad del estudio de asociación de exoma completo..... | 57 |
| 3. Estratificación poblacional..... | 58 |
| 4. Gráficas quantile-quantile, “QQ-plots” y Manhattan plots..... | 60 |
| 5. Pruebas de asociación del estudio de genoma completo..... | 65 |
| B. Estudio de la replica..... | 73 |
| 1. Datos de la población..... | 73 |
| 2. Datos del genotipado..... | 74 |
| 3. Pruebas de asociación en la réplica..... | 75 |
| V. Discusión..... | 81 |
| 1. Consideraciones generales..... | 83 |
| 2. Genes implicados en la mielosupresión..... | 83 |
| 2.1 El gen <i>IL6ST</i> | 83 |
| 2.2. El gen <i>FSTL5</i> | 86 |
| 2.3. El gen <i>TPMT</i> | 88 |
| 3. Genes implicados en la eficacia..... | 90 |
| 3.1. El gen <i>PION</i> | 90 |
| 3.2. El gen <i>ZNF673</i> | 94 |
| 3.3 El gen <i>ZNF138</i> | 97 |
| VI. Conclusiones..... | 101 |
| VII. Bibliografía..... | 105 |
| VIII. Anexos..... | 133 |
| 1 ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACION INICIAL..... | 135 |
| 2 ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES DEL GRUPO DE REPLICA: | 137 |
| 3 ANEXO: LISTADO DE SNPs SELECCIONADOS PARA LA REPLICA: | 140 |
| 4 ANEXO: LISTADO DE INICIADORES UTILIZADOS EN LAS REACCIONES iPLEX:..... | 140 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Descripción de las variantes y diseño de los cebadores usados en la PCR Múltiple. | 43 |
| Tabla 2: Programa de amplificación de la PCR Múltiple | 43 |
| Tabla 3: Reactivos y cantidades utilizadas en la PCR Múltiple | 43 |
| Tabla 4: Reactivos usados en la reacción de SNaPshot | 45 |
| Tabla 5: Programa de secuenciación usado en la reacción de SNaPshot | 45 |
| Tabla 6. Programa de amplificación de la iPLEX. | 49 |
| Tabla 7. Variaciones en masa de los ddNTPs para SBE-Sequenom MassARRAY® System. | 49 |
| Tabla 8. Datos demográficos de los pacientes tratados con AZA incluidos en el estudio. Población inicial. | 56 |
| Tabla 9. Esquema de trabajo del control de calidad para muestras y SNPs posterior al estudio del GWAS. | 58 |
| Tabla 10. Probabilidades de cada componente ancestral en casos y en controles. | 60 |
| Tabla 11. Resultados del análisis de asociación del GWAS para efectos adversos globales. | 66 |
| Tabla 12. Resultados de análisis de asociación GWAS para pancreatitis. | 67 |
| Tabla 13. Resultados de análisis de asociación GWAS para mielosupresión. | 68 |
| Tabla 14. Resultados de análisis de asociación GWAS para eficacia | 69 |
| Tabla 15. Distribución genotípica en la población total y diferenciada entre casos y controles en los genes <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> de los pacientes incluidos en el estudio. | 70 |
| Tabla 16. Distribución alélica en los genes <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> para casos y controles para los EA globales y estratificados. | 71 |
| Tabla 17. Relación entre las variantes en <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> con la respuesta en pacientes tratados con AZA. | 72 |
| Tabla 18. Datos demográficos de los pacientes incluidos como grupo de réplica. | 74 |
| Tabla 19. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto para el desarrollo de efectos adversos globales. | 76 |
| Tabla 20. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando pancreatitis. | 77 |
| Tabla 21. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando mielosupresión. | 78 |
| Tabla 22. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando la eficacia. | 80 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Áreas de ligamiento con EII identificadas por Genome Wide Scan y estudios de replicación..... | 10 |
| Figura 2. Contribución de los Genome Wide Association Studies (GWAS), a la identificación de loci de susceptibilidad a la EII. | 12 |
| Figura 3. Esquema general del metabolismo de la Azatioprina..... | 14 |
| Figura 4. Representación gráfica de variantes alélicas más frecuentes en caucásicos del gen <i>TPMT</i> | 17 |
| Figura 5. Representación gráfica del gen de la <i>ITPA</i> | 19 |
| Figura 6. Distribución genómica de los SNPs incluidos en los dos paneles del Affymetrix GeneChip® Human 20K cSNP kit 20K..... | 33 |
| Figura 7. Alineamiento de las sondas de análisis al ADN genómico. | 34 |
| Figura 8. Adición en frío y en calor de reactivos..... | 35 |
| Figura 9. Proceso de ligamiento enzimático. | 35 |
| Figura 10. Incorporación del dNTPs complementario al SNP en estudio. | 36 |
| Figura 11. Digestión enzimática de exceso. | 36 |
| Figura 12. Diagrama del sitio de corte. | 37 |
| Figura 13. Diagrama de sonda invertida. | 37 |
| Figura 14. Amplificación de sondas lineares en primera PCR. | 38 |
| Figura 15. Resumen de la primera etapa de análisis hasta la primera PCR. | 38 |
| Figura 16. Diagrama de unión del iniciador alelo específico en segunda PCR..... | 38 |
| Figura 17. Programa de amplificación de segunda PCR..... | 39 |
| Figura 18. Digestión del producto de la 2da PCR..... | 39 |
| Figura 19. Alineamiento del producto marcado de la 2da PCR al <i>chip</i> | 40 |
| Figura 20. Imagen del Gene Chip y proceso de carga de las muestras. | 40 |
| Figura 21. Proceso de lavado. Estación de fluidos GeneChip. | 41 |
| Figura 22. Electroforesis capilar de los productos de la PCR multiplex. | 44 |
| Figura 23. Imagen del equipo secuenciador de ácidos nucleicos ABI 3730xl. | 46 |
| Figura 24. Imagen de los electroferogramas generados en el análisis de SNaPshot..... | 46 |
| Figura 25. Electroferograma de las variantes analizadas..... | 47 |
| Figura 26. Desarrollo secuencial esquematizado del genotipado usando la plataforma sequenom (iPLEX). | 50 |
| Figura 27. Distribución de los Efectos Adversos presentados en los pacientes recibiendo Azatioprina incluidos en este estudio. Población inicial..... | 57 |
| Figura 28. Cluster plots de casos y controles utilizando STRUCTURE. Comparación alélica en el estudio de la estratificación poblacional | 59 |
| Figura 29. Gráficas Quantile-Quantile del GWAS para: A) Efectos adversos globales, B) Pancreatitis, C) Mielosupresión y D) Eficacia..... | 62 |
| Figura 30. Estudio de asociación genética de genoma completo, GWAS (Manhattan Plots) para: A) Efectos adversos globales, B) Pancreatitis, C) Mielosupresión y D) Eficacia. | 64 |
| Figura 31. Detalle de la región cromosómica 4q32.3 según el USCS Genome Browser de la Univ. De California, USA..... | 79 |
| Figura 32. Diagrama de interacción génica entre el gen <i>IL6ST</i> y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular..... | 84 |
| Figura 33. Diagrama de interacción génica entre el gen <i>FSTL5</i> y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular..... | 87 |

| | |
|---|----|
| Figura 34. Diagrama del complejo gamma secretasa | 91 |
| Figura 35. Diagrama representando A: Estructura de los receptores de Notch y sus ligandos y B: Esquema de la vía de señalización de Nocth | 92 |
| Figura 36. Diagrama de la estructura básica de una proteína dedos de zinc del tipo C2H2..... | 95 |
| Figura 37. Diagrama de interacción génica entre el gen <i>ZFN138</i> y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular..... | 98 |

I. Introducción

1. ¿De dónde viene y por qué la Farmacogenética?

El hecho de que un individuo reaccione de manera diferente a otro ante la exposición a un fármaco es un hecho evidente y que se reconoce desde el inicio de la medicina. Variabilidad en la respuesta de los pacientes a los medicamentos constituye la regla, y no la excepción.

La respuesta a una intervención farmacoterapéutica puede ser considerada favorable o desfavorable. En el primer caso se hablaría de una respuesta adecuada cuando se logra llegar a la respuesta terapéutica óptima y esperada, en el tiempo justo y sin complicaciones adicionales para el paciente. Por el contrario, estaríamos frente a una respuesta desfavorable cuando por ejemplo, se presente el desarrollo de algún o algunos efectos adversos (EA) o no se logre alcanzar ningún beneficio terapéutico.

Aunque la dosis administrada sea la misma, el efecto provocado puede variar de forma muy apreciable entre los individuos que lo reciben. Está descrito que ante este fenómeno, participan varios factores que, en diferentes grados, cada uno contribuye a la forma en que un individuo reacciona ante el fármaco administrado, y entre éstos se deben considerar: la administración conjunta con otros medicamentos, la dieta, el hábito de fumar, el deterioro de la función de algún órgano u órganos (principalmente riñones e hígado), factores psicológicos (efecto placebo) y especialmente los factores genéticos, entre otros.

En este sentido, ha emergido en las últimas décadas un gran interés por una subespecialidad de la medicina genética, que aunque no es nueva, rápidamente se ha concretado como la dirección a corto plazo de la investigación biomédica, con el fin de lograr la llamada "Medicina Personalizada", y con esto nos referimos a la farmacogenética.

Conceptualmente, es necesario diferenciar dos conceptos importantes y que han llegado a ser utilizados de forma indiscriminada, bajo cierta habilidad intercambiable, aunque claramente se pueden establecer sus límites y observar su diferencia. Cuando hablamos de farmacogenética, nos referimos al estudio de la variabilidad existente a nivel de la secuencia del ADN (genes) en consideración de la respuesta del organismo al fármaco, es decir, como afecta esta variabilidad genética la forma en que un individuo se enfrenta y responde ante el fármaco administrado. Por otro lado, la farmacogenómica, para muchos, con un campo de estudio más amplio, se refiere al estudio de las variaciones a nivel del ADN y ARN en relación con la respuesta a fármacos. La primera podría ser considerada como un apartado de la segunda y de forma más sencilla se podría decir que la farmacogenómica es la encargada de buscar las variaciones a nivel genómico, mientras que la farmacogenética se encargaría del estudio de cómo esas variaciones alteran o modifican la respuesta ante un fármaco.

Por otro lado, especular acerca del origen de la farmacogenética es difícil. Sin embargo, es reconocido que desde la década de los 50, el término como tal comenzó a usarse en

comunicaciones de grupos de investigadores que notaban que algunos EA a fármacos podrían ser causados por variaciones en la actividad de enzimas importantes en sus rutas metabólicas y que las mismas estaban determinadas genéticamente (1). Tal es el caso de la presencia de una relajación muscular prolongada posterior a la administración de succinilcolina, y que fue explicada por una deficiencia de la enzima colinesterasa plasmática. (2). Al igual que el caso de hemólisis causada por el uso de medicamentos antimaláricos asociada a la herencia de variantes de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3). Ciertamente el término farmacogenética como tal fue introducido al ámbito científico en el año 1957 por Vogel (4), mientras que el término farmacogenómica aparece por primera vez en el año 1997, usado para describir el análisis del genoma completo como una aplicación de la farmacogenética (5).

2. Evolución de la Farmacogenética

Los primeros estudios farmacogenéticos fueron dirigidos a mirar la asociación entre un fenotipo definido (como la disposición –farmacocinética- o la respuesta al fármaco), con un único gen en particular, mediante el diseño experimental o la estrategia de “Genes Candidatos”. Donde partiendo de una hipótesis, se prueba o se niega la posible relación de dicha variante genética con la variabilidad del efecto ante el fármaco. Durante este periodo de investigación fueron muy enriquecedoras las investigaciones centradas en genes relacionados con enzimas metabólicas, tales como, el grupo de los CYP450. Posteriormente, fueron ganando gran interés otros grupos de genes como los transportadores, proteínas diana (targets), receptores y también enzimas involucradas en otras vías metabólicas asociadas con procesos de respuesta inmunológica o actividades mitocondriales (6).

Gracias al empleo de esta estrategia de “Genes Candidatos”, se puede asegurar que la farmacogenética ha crecido asentada sobre bases fuertes, transformándose en una herramienta útil al alcance de la aplicación clínica. Su evolución ha llevado a que agencias reguladoras internacionales como la *European Medicines Agency* (EMA) en Europa y la *Food and Drug Administration* (FDA) en los Estados Unidos, desarrollen medidas públicas para que sea incorporado en el prospecto de algunos fármacos las pruebas genéticas necesarias para la evaluación farmacogenética de su uso. Por citar algunos ejemplos, tenemos el caso del *irinotecan*; un compuesto antineoplásico cuyo metabolismo se ve afectado por un polimorfismo de longitud en el gen *UGT1A1* (7). El caso de la warfarina y el *CYP2C9* (8), y también el del *CYP2D6* con la activación metabólica del tamoxifeno utilizado en cáncer de mama (9). Siendo también un importante ejemplo, del tipo clásico, el que muestran los polimorfismos del gen Tiopurin S-Metiltransferasa (*TPMT*) y las variaciones en el metabolismo y la respuesta ante las tiopurinas; agentes inmunomoduladores utilizados como inmunosupresores en varias entidades clínicas (10-17).

De forma general se podría decir que la estrategia de genes candidatos ha sido muy útil para estudiar genes relacionados con toxicidad ante el fármaco, como el *TPMT* y el *UGT1A1*, no

siendo así para el fenómeno de respuesta (con excepción de casos puntuales como la warfarina/*CYP2C9*). Probablemente esto se deba a que el proceso en sí, involucra una red más compleja de interacciones, poca o no conocida, uniéndose a una mayor cantidad de genes (más que los obvios genes metabolizadores), que influyen en el complejo proceso.

En este sentido, en la última década, el desarrollo de tecnologías de genotipado de alto rendimiento, bajo el concepto de “Estudios de Genoma Completo” (Genome-wide association studies –GWAS-), han permitido enormes avances en el entendimiento y comprensión de muchos procesos biológicos, entre ellos la respuesta a fármacos. Con este tipo de herramienta es posible analizar cientos de miles de variantes alélicas, especialmente polimorfismos de nucleótidos simples (Single nucleotide polymorphisms –SNPs-), en una gran cantidad de individuos de forma simultánea, y así poder relacionar las variables más significativas con una enfermedad o una característica en particular.

La herramienta del GWAS es considerada puntera y revolucionaria en el campo de las asociaciones porque permite estudiar el genoma humano completo con una resolución sin precedentes, y tal vez, con una de las ventajas más importantes, ya que se parte sin la necesidad de establecer una hipótesis previa (*Hypothesis Free*). Permitiendo bajo un diseño experimental acoplado a ciertos requisitos de control de calidad y condiciones de muestreo y validación, indagar sobre genes particulares, genes nuevos, rutas metabólicas o procesos biológicos anteriormente desconocidos o pobremente entendidos, aportando información nueva y valiosa sobre la etiología o el trasfondo molecular de muchos procesos biológicos.

En teoría, la identificación de factores genéticos que influyen en la absorción del fármaco, el metabolismo y la acción a nivel del receptor debe permitir acercarse a la terapia individualizada, optimizando la eficacia y minimizando los perfiles de toxicidad en una población dada (18,19). El beneficio potencial derivado del ahorro del gasto sanitario a través del logro de una mayor eficacia de los medicamentos, sumándose a la posibilidad de disminuir la morbilidad y la mortalidad gracias a una mayor seguridad en el uso de los fármacos y por consiguiente a la posibilidad de que se presenten menos efectos adversos (EA) a los medicamentos es inmenso (20-23).

Es considerable que muchos de los EA pueden llegar a prevenirse, y aunque algunas veces estos pueden llegar a ser atribuidos a errores humanos, otros parecen idiosincráticos, y posiblemente influenciados por factores genéticos. En un estudio donde se evaluaron 2.227 tipos diferentes de EA en un hospital universitario de Utah, Estados Unidos, en un periodo de 3 años, se concluyó que el incremento en el tiempo de estancia hospitalaria y los gastos de hospitalización por EA eran sustanciales y que el riesgo de muerte igualmente aumentaba casi 2 veces sobre lo normal (24).

Todo esto toma sentido cuando reflexionamos sobre la atención y el cuidado al paciente. Cuando hablamos del cuidado al paciente, debemos considerar que el diagnóstico de variantes genéticas puede -y cada día es más evidente-, llegar a ayudar de manera asertiva el manejo clínico farmacológico, mejorando la eficacia y la seguridad en la administración del fármaco. Hay que reconocer también el esfuerzo que están haciendo, tanto los médicos clínicos como las agencias reguladoras, para comunicar y hacer posible la integración de estas pruebas de laboratorio a la práctica diaria, y al conocimiento acerca del beneficio farmacogenético que de ellas se desprende y por consiguiente la mejora a la atención integral del paciente.

3. Definición de Enfermedad inflamatoria Intestinal.

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se define como un grupo de entidades patológicas que clínicamente se presentan como un proceso inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal. En esta definición se incluyen dos trastornos de etiología desconocida, la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU) (25,26).

La diferenciación clínica primordial entre ambas patologías radica principalmente en la región y forma de las lesiones a lo largo del aparato digestivo. La CU se presenta exclusivamente en el colon, la inflamación se distribuye de manera continua a nivel de la mucosa y submucosa, con extensión variable. Caracterizada histológicamente por ulceración, hemorragia, edema y regeneración epitelial. Por el contrario, en la EC, las lesiones pueden ubicarse a cualquier nivel del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, con límites definidos pero con una distribución habitualmente discontinua, con alternancia entre zonas normales y afectadas. Frecuentemente la inflamación progresa de forma agresiva y puede llegar a extenderse hasta la capa serosa, siendo habitual la formación de fístulas. Histológicamente se caracteriza por presencia de ulceraciones focales, agregados linfoides, fibrosis y granulomas no caseosos. La afectación puede presentarse a varios niveles, siendo más frecuente a nivel del intestino delgado, sobre todo el íleon terminal, también hay afectación ileocólica y en menor grado afectación cólica exclusiva. Existe afectación anal y perianal en muchos casos, y el esófago, estómago y duodeno están afectados en un porcentaje importante de los pacientes (27).

3.1 Manifestaciones clínicas de la EII

Los síntomas más frecuentes de la CU son: diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre y pérdida de peso. Puede manifestarse como una colitis fulminante con sangre abundante, anemia, hipoalbuminemia, alteraciones hidroelectrolíticas, fiebre y taquicardia; pudiendo evolucionar a megacolon tóxico. La complicación más grave y frecuente en la CU de larga evolución es el cáncer (25,26).

En la EC, los síntomas más frecuentes son: el dolor abdominal a menudo postprandial de tipo cólico, diarrea y retraso del desarrollo. Al comienzo puede haber anorexia, astenia, fiebre intermitente y manifestaciones articulares, orales o cutáneas. En ocasiones, se manifiesta de

forma semejante a una apendicitis. Existe lesión perianal en forma de fisura, fístula o absceso en un 25-50% de los pacientes (25-27).

3.2. Epidemiología de la EII

La EII se define como común entre los países desarrollados con tasas de prevalencia de 1 por 250 en poblaciones del norte de Europa, siendo particularmente común en población juvenil (26,28). Se ha descrito que la incidencia de la EC se ha incrementado de 8 a 10 veces en los últimos 50 años (29), mientras que la incidencia de la CU ha permanecido relativamente estable.

La EC se presenta principalmente en zonas urbanizadas, en países desarrollados, asociándose su incremento a la mejora en los estándares de vida, dieta e higiene de las sociedades occidentales; mientras que la CU presenta una distribución más global y generalizada. En todo caso, se observa que la aparición de EII varía con la localización geográfica, grado de industrialización y habilidad para el diagnóstico, y se estima que la incidencia va desde 0.5 a 24.5 por cada 100.000 habitantes al año para CU y desde 0.1 a 10 por 100.000 habitantes al año para EC (30,31), reflejándose un gradiente de norte a sur, presentando las mayores incidencias en países como Estados Unidos y del norte de Europa (Escandinavia y Escocia, con las cifras mayores, seguidos por Inglaterra), disminuyendo hacia los países del sur y zonas mediterráneas, y estando casi ausente o con frecuencias muy bajas en países asiáticos y del centro y sur de América (29,32,33).

En general, se acepta que ambos sexos se afectan por igual, aunque en algunos casos se ha observado un discreto predominio masculino. De igual forma, existe una distribución muy diversa entre las edades de aparición llegándose a describir dos picos importantes, uno en la adolescencia (14 años) y otro en la edad adulta (60 años) (34). También, se han visto diferencias muy marcadas en el desarrollo de la enfermedad entre diversos grupos étnicos. Se observa que la incidencia es claramente mayor en áreas urbanas con población caucasoide, especialmente de ascendencia judía (28,35), y que disminuye en grupos afroamericanos e hispanos y siendo aún menor en asiáticos (36). Este comportamiento sugiere una interacción de factores ambientales y un componente étnico-genético importante para el desarrollo de la enfermedad.

3.3. Etiología y patogenia de le EII

Hasta el momento no se conoce la etiología de la EII; sin embargo, existen diversas hipótesis que tratan de explicar su aparición. Se habla de la instalación en cierto momento de la vida de una disfunción entre el sistema inmunológico y determinados factores lumbales del intestino del paciente, siendo la enfermedad el resultado de una respuesta inflamatoria inapropiada frente a los elementos intestinales normales, debido a un defecto en la función de barrera de la mucosa a causa de una defectuosa regulación del sistema inmune (37,38).

También se habla de la “Hipótesis de la higiene”, donde se postula que cambios en el estilo de vida, como la mejora en las condiciones de limpieza, se asocian a una poca o baja exposición a agentes microbianos, en especial, a edades tempranas de la vida, lo que llevaría al desarrollo de un sistema inmune “anormal” que sería poco eficiente e incapaz de tolerar de manera adecuada una variedad de cambios exógenos a lo largo de la vida y, por ende, presentar una respuesta inmune incapaz de eliminar agentes externos dañinos resultando en el desarrollo del proceso inflamatorio crónico que podría culminar como una EII (39,40).

Igualmente se plantean numerosos factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la EII. Entre ellos, el tabaquismo, la dieta, el uso de diversos fármacos, el estrés, la permeabilidad intestinal alterada y la apendicectomía han sido relacionados con la etiología de EC y CU en diferentes medidas (41). Los más documentados son el tabaco y la apendicectomía. En el primer caso, el fumar cigarrillos parece tener un efecto negativo al desarrollo de la EC y protector para la CU (42,43), mientras que la apendicectomía parece estar relacionada con la forma juvenil de la enfermedad y se presenta como un factor protector contra la CU mientras que favorece la aparición de la EC (44,45).

Estos aportes pueden sugerir la existencia de vías patogénicas comunes, pero a la vez no determinantes, lo que apoya la definición de que la EII no es más que un grupo heterogéneo de desórdenes crónicos digestivos que comparten algunos, pero no todos, los agentes desencadenantes necesarios, revelando la importancia de la confluencia de factores medioambientales con la predisposición genética del paciente.

3.4. Genes y predisposición

Los estudios epidemiológicos entre distintos grupos étnicos, los análisis de casos con agregación familiar, y los estudios en gemelos, entre otros, proporcionan una evidencia clara de la existencia de una marcada susceptibilidad genética para la EII. No pudiéndose asignar un patrón mendeliano específico, se ha definido como una enfermedad de herencia compleja.

En el año 2003, un estudio con 38,507 gemelos daneses estimó una heredabilidad bastante elevada con base a la concordancia de EII entre gemelos monocigóticos y dicigóticos, con una distribución entre un 58.3% para EC y 18.2% para CU en los monocigóticos y de 0% y 4,5% para dicigóticos, respectivamente. En efecto, se ha descrito que la heredabilidad en EC es mayor que para muchas otras enfermedades de genética compleja (46).

Por otro lado, la agregación familiar se considera que es el factor de riesgo más importante para padecer la enfermedad. El riesgo relativo para un hermano de un paciente con EC varía entre 13 y 36, y entre 7 y 17 para un hermano con CU (46-48). El mayor riesgo lo presentan los hijos de padres afectados, estimado en mayor de 30% sobre los 28 años (49,50).

Igualmente, los enfermos con EC y con historia familiar suelen presentar un inicio más temprano de la enfermedad que aquellos que no la tienen. Así, alrededor del 30% de los pacientes diagnosticados menores a 20 años tienen historia familiar positiva de EII (51). La gravedad del cuadro clínico resulta similar entre los casos familiares y los esporádicos, e igualmente no se ha observado fenómeno de anticipación en la EII (52).

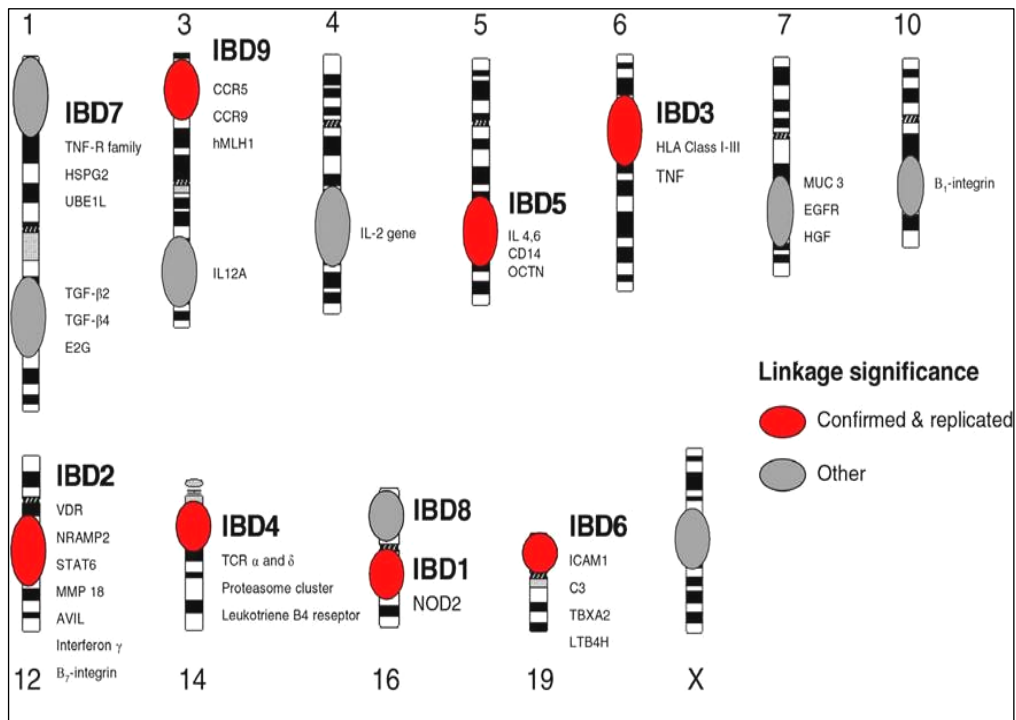
Otro fuerte argumento para apoyar el papel de la contribución genética en el desarrollo de la EII, son las marcadas diferencias en la distribución de la enfermedad entre los diferentes grupos étnicos; donde las cifras más altas las presentan los grupos caucasoide y en especial los judíos Askenazi, con una prevalencia de 2 a 4 veces superior a la de cualquier otro grupo étnico, de forma independiente a la localización geográfica y al periodo del estudio (53,54).

Por otro lado, en las últimas décadas, el desarrollo de nuevas tecnologías ha incrementado el conocimiento sobre el componente genético de enfermedades comunes, siendo el caso de la EII, especialmente de la EC. Los avances en el descubrimiento de genes de susceptibilidad proceden de varias fuentes importantes; los estudios de ligamiento, los estudios de genes candidatos en casos y controles y, más recientemente, los estudios de genomas completos. Estas investigaciones han permitido reconocer e identificar genes específicos para cada entidad y algunos compartidos por ambas, lo que ha permitido conocer un poco y desentramar el complejo mecanismo molecular que subyace en la génesis de la EII.

La primera descripción de una asociación genética para la EII, en concreto para la EC, se remonta al año 1996, cuando Hugo y cols., (55) mediante un estudio de ligamiento en familias con EC identificaron un locus putativo en el cromosoma 16, que luego fue denominado IBD1 (Inflammatory bowel diseases 1). En esta región se encuentran genes candidatos como el *CD19*, *SNP*, *CD11*, *IL4R*, que codifican proteínas relacionadas con el sistema inmunológico, como receptores de membrana de linfocitos T e interleucinas pro-inflamatorias. A pesar de la pequeña significación estadística reportada en este estudio inicial ($p < 0.01$), esta región ha sido exitosamente replicada en investigaciones independientes en varias poblaciones del mundo (56-58). Por ejemplo, un estudio realizado por el Consorcio Internacional de EII que involucró el análisis de 584 pares de hermanos reportaron un LOD-Score (LS) de 5.79 para esta región cromosómica (59). Sin embargo, en el trabajo inicial los autores concluyen que este locus representaba solo un 10% de incremento del riesgo para parientes de primer grado (55).

Tal como se indica en la Figura 1, con los años y gracias a los resultados de múltiples investigaciones se han identificado numerosas regiones a lo largo de todo el genoma ligadas a la EII, por lo general de gran tamaño (varias megabases) y conteniendo múltiples genes. Estas regiones han podido ser replicadas varias veces, mientras que otras, tras el estudio de asociación inicial no han podido serlo (60-63).

Figura 1. Áreas de ligamiento con EII identificadas por Genome Wide Scan y estudios de replicación.
 *Tomada de Gastroenterology 2004; 126:1533-1549. (63)



En términos generales, aunque aún falta mucho por entender, existe mayor conocimiento sobre la bases moleculares de la EC que de la CU, probablemente debido a que los primeros estudios y las principales investigaciones se desarrollaron enfocados en esta entidad; sin embargo, como se ha visto existen genes exclusivos y otros compartidos, con un efecto leve o moderado en el desarrollo de cada EII. Se permite suponer entonces que ambas enfermedades poseen vías etiológicas similares y algunos genes o factores determinantes comunes que hace que varíen en gran medida el efecto sumatorio de cada uno de estos factores en el desarrollo del fenotipo.

En el año 2001, Ogura y cols., en un estudio de asociación con casos y controles describen el primer gen candidato de predisposición a la EC en la región IBD1; **NOD2** (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*, conocido previamente como *caspasa recruitment domain protein 15/CARD15*) (64). En este gen se han descrito una gran cantidad de variantes diferentes y asociadas como causales de la enfermedad. De ellas, dos mutaciones de sentido erróneo; R702W y G908R y una mutación de cambio de marco de lectura (*frameshift* 1007fs), son

las más frecuentemente relacionadas con el incremento de la susceptibilidad de padecer EC. En individuos heterocigotos el riesgo relativo aumenta de 2 a 3 veces, mientras que para homocigotos o heterocigotos compuestos varía entre 28 y 40 veces. Igualmente, estas mutaciones se han asociado al fenotipo más severo y de inicio más temprano de la enfermedad (65,66). Pero aun así, la penetrancia de mutaciones en este gen se ha estimado entre un 5 y 10% (67), lo que implica que no puede considerarse como único responsable de la etiopatogenia de la EC.

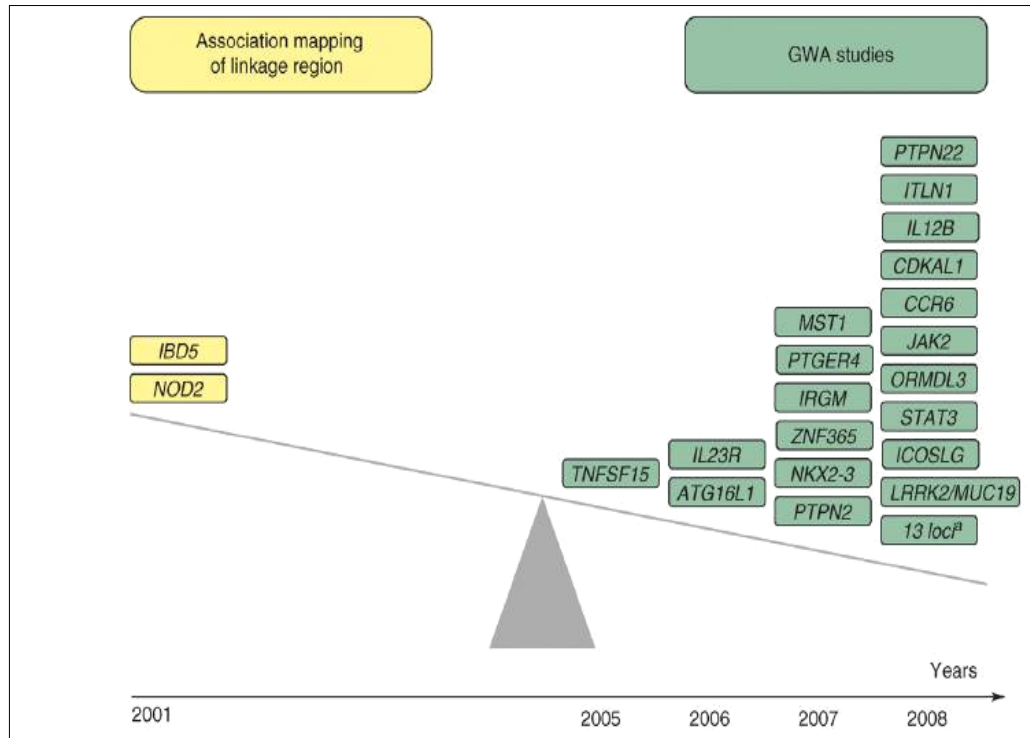
El NOD2 codifica para una proteína receptora de membrana encargada del reconocimiento de productos de rupturas del proceso de degradación bacteriana; los dipéptidos de muramílglucanos (MDP). Estos estimulan la producción de *Defensinas*, un péptido antibacteriano en las células de Paneth del intestino, que intervienen directamente en la defensa ante la invasión de patógenos (68). La reducción de la expresión de *Defensinas* ha sido asociada con portadores de mutaciones en NOD2 (69).

Otras regiones genómicas, replicadas en varias poblaciones, van desde IBD2 a la IBD9 (Fig. 1). Cada una con diferentes grados de asociación o ligamiento. Por ejemplo, Satsangi y cols., identificaron un locus de susceptibilidad en la IBD2, tanto para EC como para UC en el cromosoma 12p13 (LOD=5.47) (70). Igualmente, el Consorcio Internacional de EII, reportó un LOD para esta región de 1,2 en EC (59). En el mismo sentido, otros autores han reportado ligamiento a esta región en diferentes grados con una u otra entidad (60-62), pero en general, hoy se acepta que el IBD2 está más involucrado en el desarrollo de CU que en EC. La región IBD3, ubicada en el cromosoma 6, involucra al complejo mayor de histocompatibilidad, el cual ha sido implicado por estudios de ligamiento y asociación a la EII, especialmente para la EC.

En general, otros loci y alelos en diferentes genes han sido propuestos para conferir riesgo o protección al desarrollo de alguna u otra entidad. El gen que codifica para la interleucina 23 (*IL-23R*), citoquina pro-inflamatoria con importante papel en la dirección de la respuesta patológica inflamatoria (71), fue asociado inicialmente a EC, pero también se está viendo asociado a CU, mientras que otros como el *NOD2* o el *ATG16L1*, este último involucrado en la autofagia, parecen ser específicos de la EC (72,73).

En los últimos años, con el análisis de genomas completos, se ha obtenido información valiosa sobre la etiología de la EII. Un meta-análisis realizado por Barrett y cols (74), agrupando los datos de 3 estudios de GWAS, logró identificar un total de 32 loci que representan solo un 20% de los alelos de riesgo para la enfermedad, principalmente para EC. Nuevamente, el gen con una asociación más alta fue el *NOD2* con una *Odds Ratio* (OR) de 3, muchos de los otros genes tienen ORs que varían desde 1.1 a 1.5, es decir son genes de bajo riesgo. (Fig. 2).

Figura 2. Contribución de los Genome Wide Association Studies (GWAS), a la identificación de loci de susceptibilidad a la EII.



El descubrimiento de nuevos genes de susceptibilidad trae como consecuencia el reconocimiento de vías metabólicas que anteriormente no estaban implicadas en el desarrollo patológico de la enfermedad, lo que permite dilucidar el complejo mecanismo patogénico de la EII, y además ofrece la opción de desarrollar nuevas herramientas terapéuticas.

3.5. Tratamiento de la EII

Hasta el momento no existe una cura definitiva para la EII. Los objetivos de los diferentes tratamientos son obtener la remisión clínica, mantener una nutrición y desarrollo adecuados y reducir el número y la duración de las recaídas. Para ello se implementa un tratamiento farmacológico, nutricional o quirúrgico, dependiendo del cuadro clínico, las necesidades del paciente y del criterio médico.

3.5.1. Terapia Farmacológica

El tratamiento farmacológico es variable, centrado principalmente en la manera de cómo responde el paciente a las diferentes terapias disponibles actualmente, siempre dirigido a

buscar y mantener la remisión de los casos. Los fármacos más utilizados son los glucocorticoides, los inmunosupresores y, en los últimos años, la terapia biológica con anticuerpos monoclonales. También se incluyen dentro de la terapia el uso de fármacos paliativos de síntomas derivados de la propia enfermedad o de los EA de las terapias de primera línea como antibióticos, aminosalicilatos, procinéticos, entre otros (76,77).

Los glucocorticoides suelen ser muy eficaces para obtener la remisión en formas moderadas y severas de la enfermedad. Se utilizan la prednisona, la metilprednisolona y la budesonida. Pero con cierta frecuencia luego de un tiempo de tratamiento puede producirse recaída clínica y, en estos casos, suele ser necesario administrar inmunosupresores como complemento de la terapia, como el metotrexato. La principal desventaja de los glucocorticoides es la producción de EA como el Síndrome de Cushing, hipertricosis, hipertensión, osteoporosis, cataratas, etc. (76). El infliximab es un anticuerpo monoclonal anti factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF- α), que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la EC fistulosa y de la refractaria, así como en dosis única para la CU severa refractaria. Los EA posibles son la fiebre, cefalea, prurito, hipo e hipertensión y dolor torácico. No se recomienda su empleo en caso de infección activa, absceso y tuberculosis (77). Con relación a los inmunosupresores los más utilizados son la Azatioprina (AZA) y 6-mercaptopurina (6-MP) por ser eficaces para tratar las situaciones de corticodependencia y corticorresistencia, y para mantener la remisión, tanto en la CU como en la EC. La dosis recomendada es de 2-2,5 mg/kg/día para la AZA y de 1-1,5 mg/kg/día para la 6-MP. El tratamiento puede mantenerse durante años, siendo los EA más frecuentes la depresión medular, fiebre, hepatitis, artralgia y pancreatitis, entre otros (78).

3.5.1.1. Azatioprina (AZA)

La AZA es un derivado imidazólico de la 6-mercaptopurina (6-MP), activo por vía oral y parenteral, con propiedades inmunosupresivas y antiproliferativas. Químicamente, es un análogo de las purinas endógenas adenina, guanina e hipoxantina. Es utilizada en el tratamiento de varias y diferentes entidades clínicas, como coadyuvante para la protección contra el rechazo en pacientes trasplantados de órganos y en diversas enfermedades inflamatorias y del sistema inmune (enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide severa, psoriasis artrítica y lupus nefrítico) (78,79). Se introdujo por primera vez en 1961, para el desarrollo del trasplante renal alogénico y, originalmente fue diseñado como una pro-droga de 6-mercaptopurina, que se utiliza para producir remisiones en la leucemia aguda infantil, como resultado de sus propiedades inmunosupresoras (80,81). Su presentación comercial es *IMUREL* de Medeva Pharma.

3.5.1.2. Metabolismo del AZA

Tanto la AZA, como la 6-MP no poseen actividad metabólica intrínseca, por lo que, antes de ejercer su efecto deben sufrir un proceso de transformación metabólico bastante complejo.

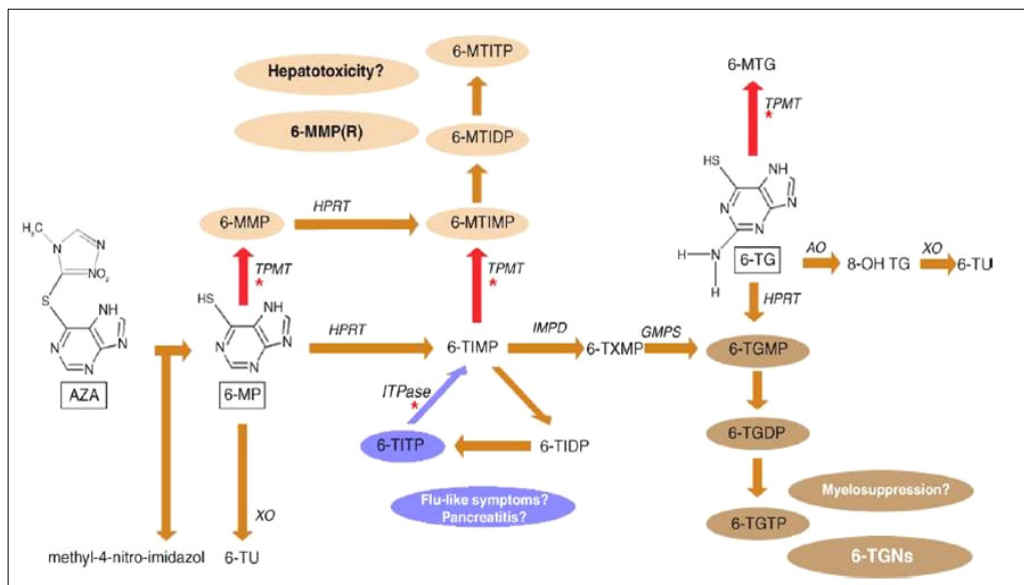
Farmacogenómica del AZA

Introducción

Una vez absorbida, aproximadamente el 90% del AZA sufre rápidamente una conversión no enzimática en el hígado, produciendo 6-MP y metil-4-nitroimidazol, mientras que el restante 10% de AZA (que es escindida también por vía no enzimática), se transforma en hipoxantina y S-metil-1-4-nitro-5-tioimidazol (82-84). Tras la captación intracelular, la 6-MP se metaboliza por tres vías enzimáticas principales (Fig. 3), dos catabólicas, mediadas por las enzimas Xantina Oxidasa (XO) y la Tiopurina S-Metiltransferasa (TPMT) y una anabólica, dirigida por la Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (HPRT) (85).

La XO y la TPMT catalizan la conversión de 6-MP a los metabolitos inactivos 6-Ácido Tioúrico (6-TU) y 6-metil-mercaptopurina (6-MMP). La HPRT, la IMPD y la GMPS son las responsables de la formación de los nucleótidos de tioguanina (6-TGNs), metabolitos activos encargados de ejercer el efecto terapéutico del fármaco (87-89), quienes como resultado de su similitud estructural con las purinas endógenas interfieren con la biosíntesis de nuevas purinas, así, son eventualmente incorporados en el Acido Desoxirribonucleico (ADN) como bases anormales, modificando su estructura e interfiriendo con la de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (90-92). Al mismo tiempo, por su homología con el GTP, mensajero intracelular, los 6-TGNs pueden producir un efecto supresorio de la proliferación de células involucradas en la determinación y amplificación de la respuesta inmune; como las células T y B, y, por tanto, la supresión de la sobreactividad de los mecanismos de defensa inmunológica en los pacientes con EII (83,93).

Figura 3. Esquema general del metabolismo de la Azatioprina.



*Tomado de Digestive and Liver Disease 37:282-97,2005. (86)

Alternativamente, el 6-TIMP se puede convertir en ribonucleótidos de 6-metilmercaptapurina (6-MMPR), los cuales son citotóxicos y se han reportado que están relacionados con el desarrollo de hepatotoxicidad (85,94). Igualmente, el 6-TIMP puede ser fosforilado para producir 6-tio-inosin di y trifosfato (6-TIDP/TITP), éste último está asociado a toxicidad en el páncreas, erupción cutánea, molestias gastrointestinales y neutropenia, en especial en aquellos individuos con defectos en la actividad de la enzima ITPA, encargada de eliminar este metabolito (95-97).

3.5.1.3. Farmacocinética del AZA

Posterior a la administración oral de la AZA, entre el 16% y el 50% de la dosis ingerida se absorbe en tracto gastrointestinal alto. Este porcentaje puede ser significativamente menor en individuos con alteraciones intestinales como la EC (26). El pico máximo en sangre se alcanza en 1-2 horas después de la administración, seguido en una caída rápida, ya que rápidamente se convierte en 6-MP. La semivida plasmática es de 12-15 min, mientras que la de 6-MP es de 30 min a 4 horas. Aproximadamente el 88% de la AZA es convertida a 6-MP en el hígado, generando compuestos como glutatión y metabolitos inactivos como el 6-TU. Hasta el 50% de la dosis se excreta en la orina dentro de las 24 horas posteriores a la administración, sin embargo, sólo una pequeña cantidad (0,10%) de la AZA se excreta sin cambios. Otro 12% de la dosis se excreta inalterada en las heces (82,98).

Una característica de la acción farmacológica de la AZA es su retraso en la aparición de su efecto, que puede tomar 8-12 semanas, posiblemente debido a la lenta acumulación de 6-TGNs dentro de las células. Esto no es necesariamente cierto en el caso de los efectos tóxicos de la AZA, algunos de los cuales pueden ocurrir en cualquier momento durante el tratamiento (por ejemplo, la pancreatitis que suele aparecer a los pocos días de iniciada la terapia) (87,88).

3.5.1.4 Efectos adversos al tratamiento con AZA

La AZA es generalmente bien tolerada sin EA serios. Sin embargo, algunos EA son muy importantes y necesitan una rápida atención; otros pueden suceder mientras el organismo se acostumbra al fármaco. Durante el tratamiento, entre un 15 y un 30% de los pacientes que reciben AZA llegan a desarrollar algún tipo de EA (93,98-103). Estos se han clasificado en relación a la dosis, como dosis independientes y dosis dependientes. Los del primer grupo suelen ser de rápida aparición y se incluyen la hepatitis, pancreatitis, erupciones de la piel, fiebre, diarrea, artralgias y náuseas. El segundo grupo son dosis dependientes y entre ellos destacan la mielosupresión y la hepatotoxicidad (86).

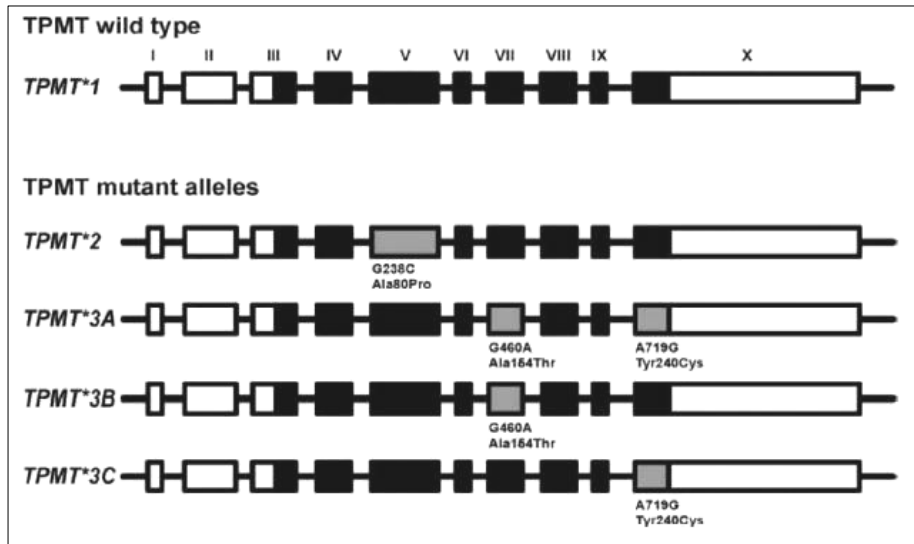
4. Farmacogenética del tratamiento con tiopurinas

Parte de la variabilidad en la respuesta a los fármacos es consecuencia de la presencia de variantes alélicas en genes relacionados con la absorción, distribución, metabolismo, proteínas transportadoras, receptores y dianas de los fármacos. En el caso de las tiopurinas, el principal enfoque de la investigación farmacogenética ha recaído sobre el estudio de la enzima TPMT, que juega un papel importante en su metabolismo catabólico y, como resultado de estas investigaciones, se ha demostrado que su actividad se encuentra regulada genéticamente (104-106).

La actividad de la enzima TPMT presenta una variación en su herencia que sigue un patrón autosómico dominante. Aproximadamente el 90% de la población tiene una actividad enzimática elevada (homocigotos para el alelo normal), cerca del 10% presentan una actividad intermedia (heterocigotos para un alelo de baja actividad), y aproximadamente 1 de cada 300 individuos poseen una actividad baja o nula (homocigotos para alelos mutados) (106).

El gen que codifica para la enzima TPMT se encuentra en el cromosoma 6, contiene 10 exones (107), y hasta la fecha por lo menos 26 variantes de alelos TPMT se han descrito y varios de ellos se han asociado con la modulación de la actividad enzimática (108-110)(Fig. 4). El alelo normal, con una actividad enzimática alta o normal, se reconoce como *1 y el resto de los alelos descritos varían desde los alelos de actividad disminuida o baja, hasta alelos que no afectan el fenotipo; TPMT*2, *3A, *3B, *3C, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *13, *14, *16, *17, *18, *19, *20, *21, *22, *23, *24, *25 y *26. Adicionalmente, se ha descrito un polimorfismo del tipo VNTR (variable number of tandem repeats) ubicado en la región promotora del gen y que regula la actividad de la enzima aumentándola, y ha sido asociado con un fenotipo metabolizador ultra-rápido (111).

Figura 4. Representación gráfica de variantes alélicas más frecuentes en caucásicos del gen *TPMT*.



*Tomada de Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2006; 4:44-49 (95).

Entre las variantes de baja actividad, las más comunes especialmente en poblaciones caucásicas son los alelos *TPMT*2*, **3A*, **3B* y **3C* (14,112-114). El alelo *TPMT*2* se caracteriza por la presencia de la transversión c.238G>C (Ala80Pro), el *TPMT*3A* por presentar las transiciones c.460G>A (Ala154Thr) y c.719A>G (Tyr240Cys), el *TPMT*3B* por solo poseer la transición c.460G>A, y el *TPMT*3C* por solo presentar la transición c.719A>G.

Estos alelos en conjunto cuentan con aproximadamente del 80 al 95% de los alelos que llevan a una disminución en la actividad enzimática debido al aumento en la tasa de proteólisis de las proteínas mutantes (113). Es de comentar, que se ha evidenciado una importante variabilidad en la distribución de las frecuencias alélicas, así como también el efecto que tienen estos alelos sobre la actividad enzimática de *TPMT* en células rojas sanguíneas (RBC) entre diferentes grupos étnicos estudiados.

En relación al metabolismo, la actividad de *TPMT* determina la tasa de formación de 6-MMP en contraposición al principio activo 6-TGNs, al ejercer su efecto en una de las vías catabólicas (detoxificadora) (Fig. 3). Una actividad disminuida de *TPMT* puede llevar a la sobreproducción de 6-TGNs y, así provocar citotoxicidad y supresión exagerada del sistema inmune o, en caso contrario, una actividad elevada daría como resultado una eliminación rápida del fármaco lo que se correspondería con tolerancia al mismo (102).

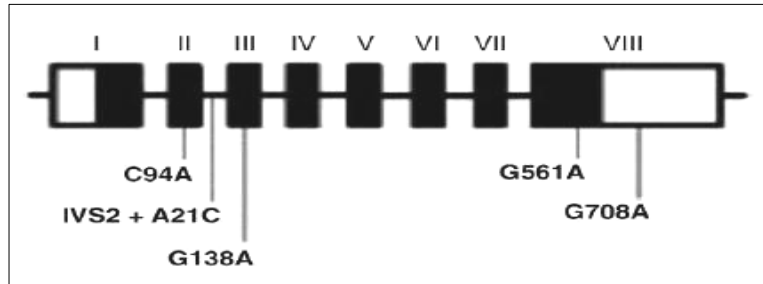
Varios estudios realizados en este campo han llegado a la conclusión de que conocer el genotipo en *TPMT* previo a la administración del fármaco permite la identificación de las personas que sean homocigotas para alelos de baja actividad y, por tanto, ser propensos de experimentar efectos tóxicos graves al ser tratados con AZA, especialmente la mielosupresión.

Sin embargo, en el caso de los individuos heterocigotos el panorama se hace más complejo puesto que la variabilidad en la respuesta ante el fármaco es muy diversa. La presencia de un alelo anormal no es suficiente para garantizar la ocurrencia de EA durante el tratamiento. Por ejemplo en un estudio realizado por Colombel y cols., en el año 2000, en pacientes tratados con AZA y que desarrollaron mielosupresión al 83% se le retiró el fármaco o se redujo la dosis, y solo un 27% de los pacientes resultaron ser portadores de un alelo de *TPMT* asociado a baja actividad (11). Contrariamente, en otro estudio de 67 pacientes con enfermedad reumatológica, solamente 6 fueron heterocigotos con un alelo *3A y en cinco de ellos se detuvo el tratamiento por la presencia de efectos secundarios (115).

Por otro lado, en los últimos años, otra deficiencia enzimática ha sido asociada a toxicidad producida por el tratamiento con AZA. La Inosín Trifosfato Pirofosfatasa (*ITPA*), cataliza la pirofosfohidrólisis de Inosín trifosfato (6-TITP) a Inosín monofosfato (6-TIMP) y su deficiencia lleva a una anormal acumulación de 6-TITP (Fig. 3), que ha sido asociada con la aparición de EA como la pancreatitis, síntomas gripales y erupciones en la piel en pacientes tratados con AZA (96,97,116,117).

El gen de la *ITPA* se ubica en el cromosoma 20 y se ha reportado que la actividad de la enzima se encuentra determinada genéticamente. Con al menos 5 variantes identificadas, de las cuales 3 (c.138G>A, c.561G>A y c.708G>A), son sinónimas y las otras 2 (c.94C>A y IVS2+21A) están asociadas con disminución de la actividad enzimática (Fig. 5). La variante c.94C>A provoca un cambio de Pro32Thr, que es compatible con problemas de conformación dimérica de la enzima (118), mientras que la IVS2+21A>C conduce a un procesamiento ineficaz (119). La presencia de estas variantes puede llevar desde ausencia completa de actividad enzimática hasta variaciones de un 10, 22,5 y 60% de la actividad fisiológica normal (120).

Figura 5. Representación gráfica del gen de la *ITPA*.



*Tomado de Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2006; 4:44-49 (95)

Al analizar estas variantes en un estudio realizado sobre 62 pacientes con EII, el alelo c.94C>A se asoció significativamente con la aparición de EA como los anteriormente descritos, con un OR de 4.2 (IC95% 1.6-11.5, p=0.0034) (96). No obstante, estos resultados se contradicen con otro estudio con 73 pacientes con EII y desarrollo de EA en donde no se observó tal asociación (OR 1.015, IC95% 0.360-2.867, p=0.593) (121).

Igualmente, Ansari y cols., en el año 2003 (117), determinaron la variante c.94C>A del *ITPA* y los alelos *2, *3A, *3B y *3C del *TPMT* en pacientes con EII, encontrando que la variante c.94C>A se asoció significativamente con EA al fármaco (OR=4,2 IC95% 1,6-11,5, p=0.0033), mientras que las variantes en *TPMT* no fueron significativamente asociados con el desarrollo de EA a la AZA en general, pero si se encontró asociación estadística significativa al predecir los EA en un subgrupo de 14 pacientes con náuseas y vómitos (OR=5.1 IC95% 1,3-19,5, p=0.0239). No se pudo demostrar asociación entre las variantes en *TPMT* e *ITPA* con mielosupresión, pancreatitis o hepatitis en este estudio.

Sobre la base de los resultados contradictorios ofrecidos por estudios como los anteriores, estos hallazgos sugieren que las variantes en *TPMT* e *ITPA* podrían en cierto grado y, a diferentes niveles, contribuir a la intolerancia a la AZA y, que no todos los EA que se presentan se deban exclusivamente a variaciones en estas dos enzimas. Hasta el día de hoy, las informaciones aportadas continúan siendo material de debate sobre el verdadero papel de los polimorfismos en los genes *TPMT* e *ITPA* y la aparición de EA en pacientes que reciben Azatioprina (121-124). Más aún hay poca o ninguna referencia sobre los mismos y la eficacia del tratamiento con AZA.

Está clara y es bien reconocida la necesidad de identificar individuos homocigotos mutantes para el *TPMT* quienes tienen las más altas probabilidades para el desarrollo de mielosupresión, y se plantea sobre ellos desde la no administración del fármaco a una administración con dosis menores acompañado de una supervisión muy precisa para controlar el desarrollo EA. Sin embargo, la mielosupresión no es el único EA presentado durante el tratamiento con AZA y la verdad es que muchas veces el desarrollo de mielosupresión no se

acompaña de la presencia de un alelo mutado en el gen *TPMT*, lo que indica que esta variante solo explicaría una pequeña porción, aunque importante, de la aparición de este tipo de EA durante el tratamiento con AZA.

Datos como estos nos indican que deben existir otros factores, variantes, genes, que de alguna forma predispongan a la aparición y desarrollo de estos tan diversos EA al tratamiento con AZA. Razón por la cual nos hemos planteado esta investigación que tiene como objetivo principal desarrollar un estudio de genoma completo con el fin de explorar la posibilidad de identificar variantes genéticas relacionadas con la eficacia del tratamiento y el desarrollo de EA que no puedan ser atribuibles a los genes implicados en el metabolismo de la AZA; *TPMT* e *ITPA*.

5. Estudios de Genoma Completos y Farmacogenética

Desde la década de los 90 los estudios farmacogenéticos estaban diseñados para estudiar el efecto de un único gen en la disposición y/o respuesta del fármaco. Sin embargo, en la era de la farmacogenómica, el efecto de múltiples genes sobre un particular fenotipo puede ser abordado de manera eficaz, especialmente cuando se observa una variación interindividual marcada ante el efecto del fármaco.

Tradicionalmente, estas investigaciones se basaban en la estrategia de *genes candidatos*, donde se relacionaba un determinado genotipo a un fenotipo en particular (respuesta o eficacia). Los genes escogidos para ser evaluados, generalmente se determinaban por el conocimiento a priori del metabolismo del fármaco; como la familia de CYP450, algunos receptores, proteínas dianas, entre otros.

Esta estrategia ha dado frutos importantes a la sedimentación de la farmacogenética dentro de la práctica clínica, como por ejemplo, es reconocible el impacto de los polimorfismos del gen *TMPT* y el uso de las tiopurinas, o de las variantes en el *UGT1A1* con el uso del irinotecan, donde la FDA (*Food and Drug Administration*), recomienda el desarrollo de una prueba farmacogenética para la identificación de estas variantes previo a la prescripción del fármaco, evidenciando el uso clínico de la investigación en farmacogenética y farmacogenómica.

Sin embargo, hoy es reconocido que la forma en que un individuo responde ante un fármaco puede ser comparado a lo que consistiría el trasfondo molecular de una enfermedad compleja. Especialmente cuando nos referimos al fenómeno de las reacciones adversas, donde desde un punto de vista molecular, un número variable de genes pueden, y de hecho, frecuentemente están involucrados.

Una alternativa a la estrategia de genes candidatos ha nacido en los GWAS. Conceptualmente, su enfoque consiste en estudiar de forma rápida miles de marcadores

genéticos a lo largo de todo el genoma de muchas personas al mismo tiempo para encontrar variaciones genéticas asociadas con una enfermedad o una característica fenotípica en particular. El aporte que esta estrategia le ha dado a la medicina molecular de hoy en día es considerablemente importante, logrando identificar variantes genéticas causales o asociadas al desarrollo de numerosas enfermedades; como la diabetes tipo 1 y 2, artritis reumatoide, enfermedad arterial coronaria, y enfermedad de Crohn, entre otras (125).

Desde el año 2007 se han reportado importantes investigaciones en el área de la farmacogenética donde utilizando esta metodología de genomas completos se han podido identificar variantes genéticas asociadas a la eficacia, toxicidad e incluso ajuste de dosis, de ciertos fármacos como el interferón- α , anti-TNF, warfarina, acenocumarol y el clopidogrel, entre otros. Una de las ventajas primordiales de los GWAS es la capacidad de realizar el análisis sin la necesidad de partir de una hipótesis previa. Lo que permite la consideración de rutas metabólicas desconocidas o variantes en genes nuevos o menos obvios que con las técnicas tradicionales habrían pasado desapercibidas.

Por otro lado, existen ciertas consideraciones a la hora de plantearse y desarrollar un GWAS farmacogenético que ciertamente han limitado, si bien no su aplicación, tal vez si la habilidad para reflejar su utilidad en esta área al ser comparadas con el estudio de otras características fenotípicas o enfermedades complejas, a saber: el tamaño de la muestra y la caracterización fenotípica, así como también muchas veces cuando el fenotipo es muy raro el conseguir un grupo adecuado para la réplica y la validación de los hallazgos iniciales.

Obtener un número adecuado de pacientes en un estudio farmacogenético es una tarea muy importante y muchas veces limitante. Se podría decir que una parte importante de los GWAS farmacogenéticos no han podido demostrar significación estadística en sus resultados ya que por lo general involucran pequeñas cohortes de pacientes con insuficiente poder para detectar variantes génicas con efectos pequeños o moderados sobre el fenotipo. Las características de respuesta o no respuesta así como el caso de EA específicos suelen ser raras y dependen también del tipo de fármaco involucrado. Igualmente, muchas veces la definición clínica del propio efecto o respuesta ante el fármaco es difícil de caracterizar o definir, apareciendo con una amplia heterogeneidad clínica que muchas veces dificulta su medición cuantitativa y categorización en grupos específicos. Lo mismo es aplicable a la hora de la réplica de los resultados iniciales. Si bien es cierto, que la validación de los hallazgos en el estudio piloto es lo que determina la relevancia de la o las variantes implicadas, muchas veces la dificultad de conjugar un número adecuado de casos y controles con características fenotípicas similares hace de las réplicas un problema difícil de superar.

Afirmando que estas circunstancias son de considerar, indudablemente el beneficio de utilizar esta herramienta es evidente en cuestión de tiempo y dinero a invertir. En sí mismo, el estudio de genoma completo tiene un mejor coste-beneficio al indagar en un solo análisis miles

de variantes alélicas estudiando la variabilidad genética común en un grupo de pacientes o poblaciones, a diferencia de lo que supondría ir paso a paso en una estrategia gen candidato. El adelanto en el conocimiento sobre la composición del genoma humano, aunado al desarrollo de plataformas de genotipado de alto rendimiento, donde pueden estudiarse regiones cromosómicas específicas, variabilidad en zonas no codificantes, presencia o ausencia de CNVs (Copy Number Variants, en inglés), o variaciones a nivel del genoma codificante, el exoma, han permitido estudiar un mayor número de hipótesis, algunas antes no pensadas, en un menor periodo de tiempo y con grandes repercusiones en la aplicación clínica.

En este sentido, en el caso particular de la farmacogenómica en el tratamiento con AZA, nos hemos propuesto emplear la herramienta del estudio del genoma completo dirigido al estudio de la variabilidad a nivel de SNPs que comprometen algún cambio a nivel proteico y así tratar de dar respuesta, si es que la hay, de cuál es el trasfondo molecular en la forma en que un individuo reacciona ante este fármaco, y que dichas diferencias en el patrón de comportamiento no pueden ser atribuibles a modificaciones en los genes clásicos del metabolismo del AZA, el *TPMT* y la *ITPA*.

II. Objetivos

Objetivo general:

- Identificar variantes génicas nuevas en un estudio de genoma completo que puedan explicar parte de la variabilidad en la respuesta (eficacia y toxicidad) ante el uso del fármaco Azatioprina en un grupo de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un estudio de genoma completo que comprende una gran parte de la porción codificante del genoma humano cubriendo alrededor de 20.000 SNPs distribuidos a lo largo de todos los cromosomas para identificar variables genéticas posiblemente relacionadas con la eficacia y el desarrollo de EA al tratamiento con AZA.
- Seleccionar un grupo de SNPs con relevancia estadística y replicarlos en una población control con características similares a la original y así determinar la posible asociación con el desarrollo de EA o la eficacia al tratamiento con AZA.
- Identificar algunos genes nuevos que puedan influenciar la variabilidad en la respuesta farmacológica ante el uso de la AZA.
- Valorar la contribución de genes *TPMT* e *ITPA* previamente descritos y relacionados al desarrollo de EA e inducidos por el tratamiento con AZA en pacientes con EII, así como también su probable relación con la eficacia del fármaco.

III. Material y Métodos

1. Pacientes y criterios de inclusión

En una primera fase se reclutaron 235 pacientes con EII por parte del Grupo Gallego de Enfermedad Inflamatoria (EIGA), en un periodo comprendido entre Octubre de 2008 y abril de 2009. Los pacientes procedían de cuatro hospitales de la comunidad de Galicia (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Hospital Arquitecto Marcide de Ferrol, Hospital Montecelo de Pontevedra y Hospital Xeral-Cies de Vigo). Como criterio de inclusión se escogieron solo aquellos pacientes que refirieron ser de origen caucásico y que habían sido tratados con Azatioprina (AZA-Imurel), por un mínimo de 6 meses (principalmente para la selección de los controles), presentaran o no efectos adversos. Todos los pacientes o los representantes legales, cuando lo ameritaba, una vez incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado previo a la participación en el mismo.

Para la evaluación diagnóstica se siguieron los criterios de Lennard-Jones (126), recomendados por el EIGA. Todos fueron examinados mediante una historia clínica de rutina donde se recogieron datos generales como etnicidad, historia familiar, estilo de vida (hábitos alimenticios y tabaquismo), resultados de las pruebas analíticas, así como otros datos considerados importantes relacionados con su diagnóstico. Tras la adopción del esquema de tratamiento, los pacientes fueron evaluados periódicamente, con inclusión de pruebas sanguíneas cada mes al inicio de la terapia y luego cada 3 o 4 meses, para el seguimiento de la evolución de la enfermedad y la respuesta clínica y/o el desarrollo de reacciones adversas al fármaco.

Los pacientes fueron clasificados como casos y controles en función de la respuesta al tratamiento y el desarrollo o no de EA. En el estudio se incluyeron un total de 233 pacientes; 156 con EC y 77 con CU. Dos pacientes fueron excluidos por no cumplir con los requisitos de inclusión. La edad promedio fue de 39 años y se observó una distribución similar entre sexos. Éstas y otras características demográficas se muestran en la Tabla 8 (Apartado de Resultados).

Para replicar los resultados de la primera en una segunda fase se analizaron 264 muestras de ADN procedentes del Estudio Nacional en Enfermedad Inflamatoria Intestinal sobre Determinantes Genéticos y Ambientales (ENEIDA). Los pacientes procedían de distintos hospitales de las comunidades de Cataluña y Madrid (Hospital Clinic, Hospital M. Terrassa, Hospital del Mar, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Hospital Germans Trias i Pujol de Barcelona, Hospital La Princesa de Madrid). Todos los pacientes fueron diagnosticados con EII; 90 con CU y 174 con EC. Como criterio de inclusión se escogieron solo aquellos pacientes que refirieron ser de origen caucásico y que habían sido tratados con Azatioprina (AZA-Imurel), por un mínimo de 6 meses (especialmente para los controles), presentaran o no efectos adversos. En

cuanto al sexo la distribución fue similar, 134 hombres y 130 mujeres, con edades entre los 9 y 78 años con un promedio de 34 años. Igualmente, todos los pacientes incluidos o sus representantes legales dieron su consentimiento informado previo al estudio.

Los datos demográficos de la cohorte de réplica se reflejan en la Tabla 18 (Apartado de Resultados). De este grupo se realizó una subclasificación de casos y controles basándose en los criterios de tiempo de exposición al fármaco y tipo de efectos adversos, así como respuesta o no al tratamiento con AZA. Los criterios fueron similares a los aplicados a la población inicial.

2. Aspectos éticos del estudio

Este estudio fue aprobado por los comités éticos de las instituciones implicadas y se ha llevado a cabo acorde a la declaración de Helsinki. Todos los individuos fueron evaluados y diagnosticados por especialistas según protocolo de referencia. Los modelos de consentimiento informado, para la primera y segunda fase, se adjuntan en el apartado VIII de Anexos de la presente tesis (Anexos 1 y 2).

3. Diseño del estudio

Para realizar la búsqueda de variantes génicas nuevas relacionadas con la toxicidad y respuesta ante el uso del AZA en pacientes con EII, hemos llevado a cabo un estudio retrospectivo del tipo caso-control en dos fases, que involucró un estudio de asociación del genoma completo considerando como categorías de análisis características relacionadas al tratamiento con AZA, específicamente la eficacia y la toxicidad.

En la eficacia, se incluyeron los individuos que respondieron o no al fármaco según los criterios clínicos recomendados y que se describirán en el siguiente punto a continuación, no considerando para el análisis aquellos pacientes con respuesta indeterminada. Para evaluar la toxicidad, igualmente se agruparon como casos y controles aquellos individuos que desarrollaron o no EA al fármaco, haciendo un análisis global de todos los EA en conjunto, así como, de forma estratificada considerando cada efecto por separado.

Las categorías quedaron identificadas como: respondedores (controles), no respondedores (casos), al evaluar la eficacia y para la toxicidad, los individuos que no desarrollaron EA (controles) y como casos todos los pacientes que desarrollaron alguno de los EA observados en nuestro estudio; “pancreatitis, mielosupresión, molestias digestivas, artralgia, hepatotoxicidad, reacciones cutáneas y alopecia”.

En el estudio se evaluó la contribución de los genes *TPMT* e *ITPA* previamente descrito en la literatura científica como relacionados a fenotipos específicos de EA al tratamiento con AZA.

3.1 Dosis y evaluación de la respuesta clínica al tratamiento

La elección de la dosis de AZA se basó, como generalmente se recomienda, en el peso del paciente (2-2.5 mg/kg/día), y no en el nivel de TPMT. De acuerdo a las recomendaciones (127-130), el tratamiento con AZA fue considerado exitoso (respondedores) si se logró una remisión clínica definida como un resultado a la evaluación de un CDAI <150 en EC, y <3 en la escala Mayo para CU, sin el consumo de esteroides por lo menos 12 meses. El fracaso del tratamiento (no respondedores) fue asumido si no se obtuvo la respuesta clínica esperada después de un tiempo adecuado de tratamiento (entre 8 y 20 meses). El estado de respuesta indeterminado se adjudicó en los pacientes donde el tiempo de exposición al fármaco no fue suficiente para evaluar la respuesta clínica, ya sea por abandono del tratamiento o por que la aparición de un efecto secundario obligo a la retirada del mismo.

3.2 Criterios Clínicos para la definición de los EA

El criterio para definir los efectos adversos fue tomado según recomendaciones de guías clínicas y/o reportes científicos previos (15,131,132). Y quedaron definidos bajo las siguientes consideraciones:

- La mielosupresión como una reducción en el número de glóbulos blancos totales ($<3.0 \times 10^9/L$), que incluye: neutropenia (recuento de neutrófilos $<1.5 \times 10^9/L$) y / o trombocitopenia (recuento de plaquetas $<100 \times 10^9/L$).
- La hepatotoxicidad como un aumento de las enzimas hepáticas ALAT o GGT de al menos dos veces el valor normal.
- La pancreatitis fue definida por la presencia de dolor abdominal severo y una elevación de 3 veces lo normal de la amilasa sérica y / o lipasa.
- La intolerancia digestiva por la presencia de diarrea, náuseas o vómitos.
- Las reacciones cutáneas cuando se presentó enrojecimiento de la piel de manera significativa.
- La artralgia cuando se presentó dolor generalizado en articulaciones.
- La alopecia por la pérdida de cabello

Todos los pacientes fueron monitoreados de cerca por medio de análisis de sangre y visitas periódicas al médico (mensual al inicio y trimestral luego de los 3 primeros meses) con el objetivo valorar la aparición y desarrollo de los EA y/o los efectos clínicos de la enfermedad. Información adicional se recuperó de la historia clínica.

4. Extracción del ADN

A cada paciente se le extrajo 10 ml de sangre periférica por venopunción con E.D.T.A como anticoagulante, el cual fue enviado a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) y almacenado a 4°C o congelado hasta el momento de su procesamiento. La extracción del ADN a cada una de las muestras recibidas se realizó mediante dos procedimientos diferentes, el método Wizard® Genomic DNA Purification Kit de la casa Promega (Promega, Madison, WI, USA). Y la extracción automatizada con *Chemagic DNA Blood 100 Kit* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany), utilizando el robot *Chemagic Magnetic Separation Module 1* (Chemagen AG). En ambos casos, siguiendo las indicaciones recomendadas por la compañía. La verificación de la cantidad y pureza del ADN extraído se realizó utilizando el espectrofotómetro NANODROP ND-1000, y posteriormente fue conservado en nevera a 4°C hasta su análisis.

5. Genotipados

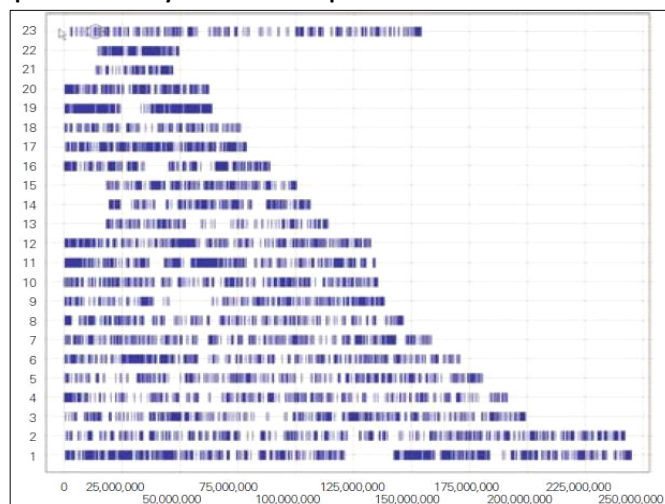
El genotipado de las muestras fue realizado en la FPGMX, en Santiago de Compostela, España. En el estudio se han empleado tres procedimientos de genotipado según las necesidades: en el análisis de asociación de genoma completo (GWAS) de la población gallega se empleó el GeneChip Human 20K cSNP de Affymetrix y el genotipado basado en la tecnología SNaPshot® para el estudio de los genes *TPMT* e *ITPA*. En el análisis de la población de réplica la tecnología MALDI-TOF-MS. Tanto la plataforma Affymetrix como la de Sequenom para el MALDI-TOF se emplearon en convenio con el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) - nodo de Santiago de Compostela.

5.1 Affymetrix GeneChip Human 20K cSNP

Para el Estudio de Asociación de Genoma Completo (GWAS), hemos utilizado el *chip* de Affymetrix GeneChip Human 20K cSNP Kit (AFFX, Santa Clara, CA). El mismo consiste de dos paneles que contienen aproximadamente 20.000 polimorfismos del tipo SNP ubicados en regiones codificantes del genoma humano, representando la misma cantidad de cambios aminoacídicos en proteínas humanas, con una cobertura en aproximadamente 10.000 genes.

El *chip* utiliza la metodología *Molecular Inversion Probe* (MIP) desarrollada por AFFX y que está diseñada para trabajar en conjunto con el GeneChip® Scanner 3000. Inicialmente, las sondas utilizadas en el diseño del *chip* se basaron en la base de datos dbSNP124 y contenía cerca de 60.000 SNPs codificantes no sinónimos. De éstos, para el primer panel solo fueron seleccionados aquellos que lograron ser validados, y llegaron a formar parte del panel 1 del Affymetrix GeneChip® Human 10K cSNP kit. Finalmente, otros 10K de SNPs codificantes fueron acoplados para integrar los paneles 1 y 2, y reunir aproximadamente 20.000 sitios polimórficos del genoma con un intervalo promedio de <70Kb entre cada SNP considerando todos los cromosomas.

Figura 6. Distribución genómica de los SNPs incluidos en los dos paneles del Affymetrix GeneChip® Human 20K cSNP kit 20K.



En el genotipado se ha empleado el protocolo recomendado por la casa comercial (AFFX).

Desarrollo del proceso de genotipado del GeneChip Human 20K cSNP

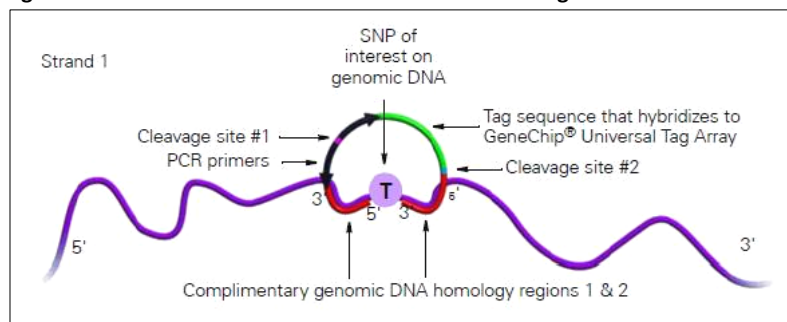
El paso inicial para la preparación del *chip* consiste en la normalización de las muestras de ADN a una concentración recomendada de 150 ng/ μ L con buffer TE1X. En nuestro caso todas las diluciones de las muestras de ADN normalizadas se prepararon en placas plásticas de 96 pozos, denominadas *placas de muestras*, identificadas y almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización. Posteriormente se procedió con el protocolo de trabajo recomendado por AFFX que está dividido en 9 pasos:

- Paso 1 – Diseño y preparación de la placa.
- Paso 2 – Anillado.
- Paso 3 – Preparación de las placas de ensayo.
- Paso 4 – Llenado de Vacíos, adición de dNTP, ligado, inversión y primera PCR.
- Paso 5 – Segunda PCR.
- Paso 6 – Digestión enzimática.
- Paso 7 – Hibridación de las muestras.
- Paso 8 – Tinción y lavado.
- Paso 9 – Lectura del *chip*.

A continuación se describe brevemente el desarrollo de cada paso:

- **Diseño y preparación de la placa:** Este paso consiste en la planificación y creación de un proyecto de análisis con información de las muestras, posición en la placa, género y tipo de ensayo a realizar o *chip* a utilizar. Un archivo con estos datos son incorporados al programa Affymetrix GeneChip® Targeted Genotyping Analysis Software (GTGS) y es utilizado por el software para preparar la placa de anillado que se utilizara en el siguiente paso. Es importante mencionar que las corridas están diseñadas para trabajar con 24 muestras de manera simultánea y que en este caso, tal y como es recomendado por la empresa, se incorporó por cada 23 muestras un control de ADN proporcionado en el Kit.
- **Anillado:** En este paso, el ADN genómico, las sondas del panel de ensayo y el reactivo de coctel de anillado, son mezclados en la *placa de anillado* y colocados en un termociclador por un periodo no menor a 16 horas y hasta 24, con una temperatura controlada de 58°C para facilitar el proceso de alineamiento entre las sondas y el ADN de la muestra.

Figura 7. Alineamiento de las sondas de análisis al ADN genómico.



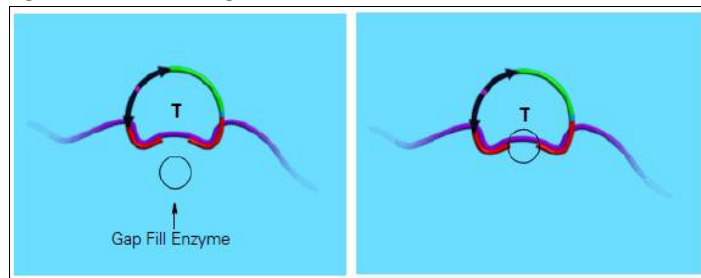
- **Preparación de la placa de ensayo:** Esta etapa es relativamente corta y se fundamenta en la planificación en el GTGS de la placa donde se realizara el ensayo propiamente dicho, y consiste en preparar una placa de PCR de 96 pozos con identificador de código de barras diferente necesario para que pueda ser reconocido por el equipo.
- **Llenado de Vacíos (Gap Fill), adición de dNTPs y ligado, inversión y primera PCR:** Esta etapa inicia con la transferencia de las muestras a la placa de ensayo dividiendo cada una en 4 alícuotas iguales. Luego se realizaran una serie de adiciones de reactivos bajo las modalidades de “Adiciones en frío” que deben hacerse en hielo, y “Adiciones en calor”, cuando las placas se encuentran en el termociclador a temperatura controlada.

Figura 8. Adición en frío y en calor de reactivos.



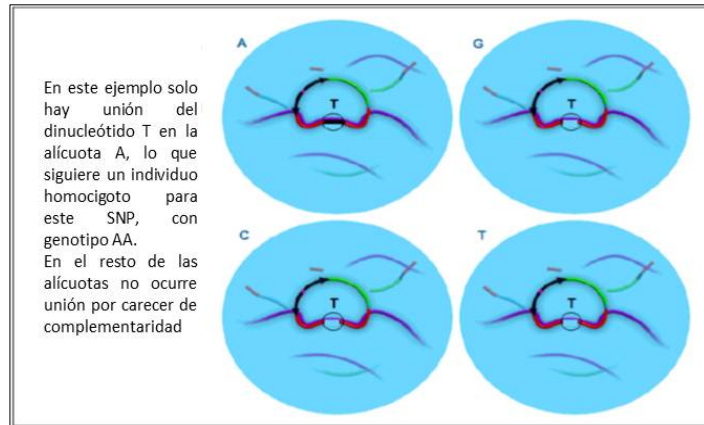
- Llenado de Vacíos (Gap Fill): este paso consiste en la adición en frío del Gap Fill Mix, una enzima encargada de posicionarse sobre el SNP interés dentro de cada muestra en el panel de ensayo, y ayudar en la incorporación del dinucleótido específico en la siguiente fase del ensayo.

Figura 9. Proceso de ligamiento enzimático.



- Adición de dNTPs y ligado: Esta es también una etapa de adición en frío donde se coloca en cada una de las 4 alícuotas un dinucleótido diferente (dATP, dTTP, dCTP y dGTP). Ahora, el dinucleótido complementario al SNP en estudio será incorporado a su sitio por medio de la intervención de la enzima “Gap Fill” con base a su complementariedad. En este momento dependiendo del genotipo para el SNP, si es homocigoto o heterocigoto, ocurrirá la unión o el llenado del “Gap” (sitio vacío) en una o dos de las alícuotas.

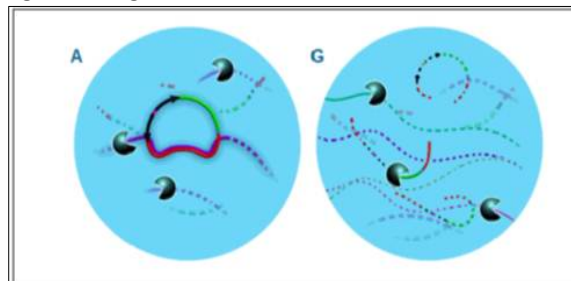
Figura 10. Incorporación del dNTPs complementario al SNP en estudio.



Una vez que el gap es llenado, por el dinucleótido correspondiente, la estructura formada entre el ADN de la muestra y la sonda del ensayo se cierra covalentemente y de manera circular y pasa a ser reconocido como “sonda cerrada con candado”.

- Adición de Exo mix: Posteriormente, a las alícuotas se les hace una adición en frío de exonucleasas, encargadas de digerir el ADN lineal presente en la mezcla de reacción, ya sea el genómico o el de las sondas no utilizadas. Estos fragmentos lineares van a estar presentes en las alícuotas de las reacciones que no fueron cubiertas en el paso anterior de llenado del vacío (Gap), es decir, aquellas donde no hubo complementariedad entre el SNP y el dinucleótido adicionado.

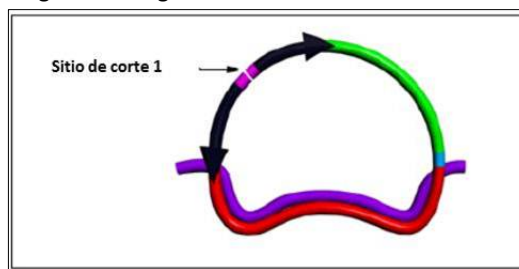
Figura 11. Digestión enzimática de exceso.



En el caso de homocigotos, se habrá dado la digestión de las moléculas lineares en 3 de las 4 alícuotas, mientras que en los heterocigotos será solo en 2 de las 4, y estas contendrán entonces ADN digerido. En el caso del ADN genómico, este también será digerido menos en los lugares donde ocurrió el cierre de la estructura en candado por la incorporación del dNTP correspondiente.

- Adición del reactivo de Escisión e inversión: La cuarta adición es en caliente y consiste en suministrar a la mezcla un enzima de restricción que cortara un complejo de candado en el sitio de escisión 1 para llevar la estructura a la forma linear y liberar del ADN genómico.

Figura 12. Diagrama del sitio de corte.



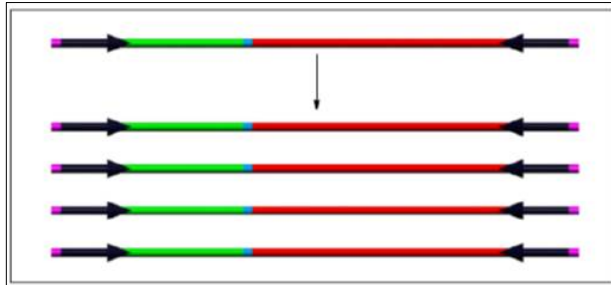
Un vez que se ha producido este corte, y como la orientación de la secuencia de los iniciadores, ha cambiado, la sonda pasa a llamarse "Sonda Invertida".

Figura 13. Diagrama de sonda invertida.



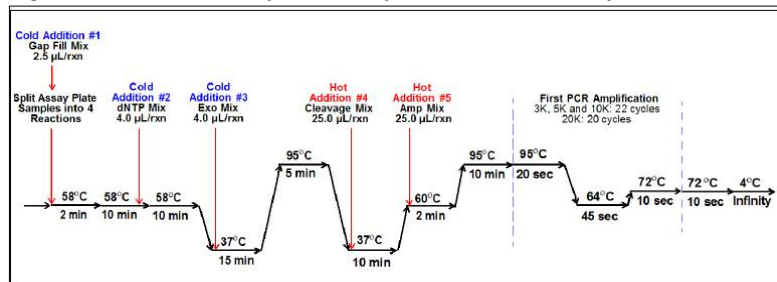
- Adición de AmpMix y primera PCR: este paso consiste en una adición en caliente del Amp Mix. En este momento la primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) comienza y las sondas lineares invertidas son amplificadas usando iniciadores comunes.

Figura 14. Amplificación de sondas lineares en primera PCR.



El producto de esta reacción es llamado ahora producto de la primera PCR. En el siguiente diagrama se puede identificar cada una de las adiciones, reactivos utilizados, y tiempo necesario en la etapa anterior.

Figura 15. Resumen de la primera etapa de análisis hasta la primera PCR.



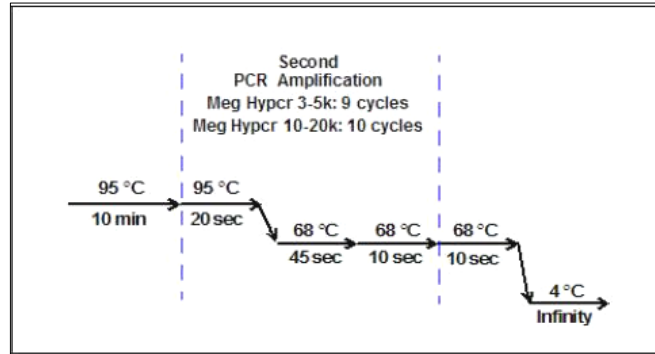
- Segunda PCR: Este paso se inicia con la transferencia del producto de la primera PCR a una placa llamada *Placa Etiquetada*. Luego de la transferencia un iniciador alelo específico diferente es adicionado a cada mezcla y se lleva a cabo la segunda PCR.

Figura 16. Diagrama de unión del iniciador alelo específico en segunda PCR.



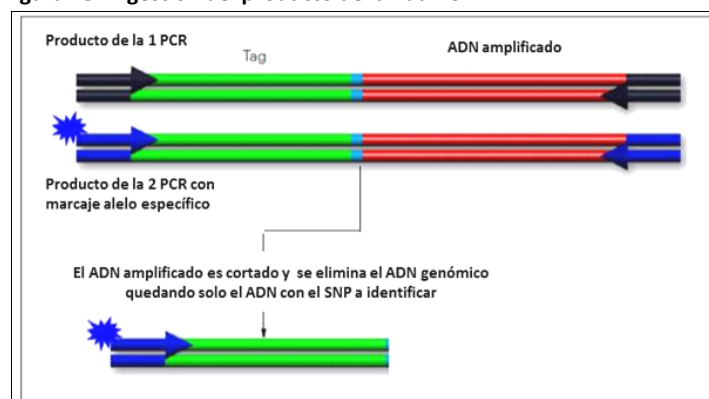
Utilizando el programa de amplificación indicado en la siguiente imagen:

Figura 17. Programa de amplificación de segunda PCR



- Digestión: En esta etapa el producto marcado de la segunda PCR es digerido en el sitio de escisión 2. Este proceso elimina el ADN genómico amplificado y libera los productos específicos donde se encuentra el SNP a identificar. En este paso se deben unificar las 4 reacciones de PCR que anteriormente estaban separas, en un solo pozo en una placa de Hibridación.

Figura 18. Digestión del producto de la 2da PCR.



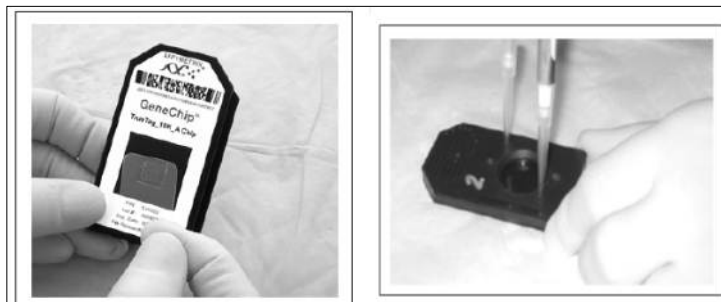
- **Hibridación de las muestras:** En este paso a cada muestra se les adiciona el *coctel de hibridación* y son colocadas en un termociclador para desnaturalización. Luego, cada muestra es colocada en un “GeneChip® Universal TagArray”, y son colocados en un horno de hibridación a 39°C entre 12 y 16 horas. Los *chips* son soportes comerciales de vidrio que contienen en pequeñas celdas miles de sondas unidas a la superficie (c-tags), las cuales deben interactuar con la sonda de la muestra (tag) y si hay complementariedad de bases se anillaran y posteriormente podrá ser identificado el alelo correspondiente.

Figura 19. Alineamiento del producto marcado de la 2da PCR al chip.



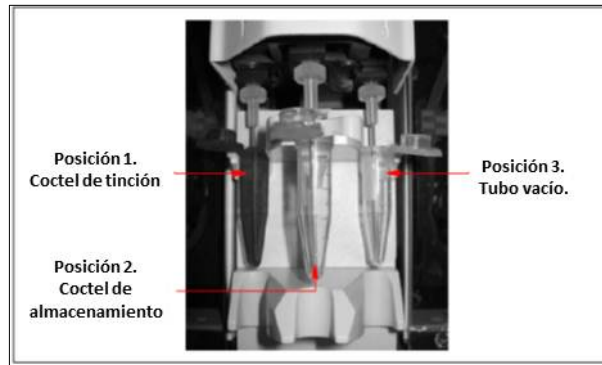
Si la muestra es de un homocigoto, solo una de las 4 sondas alelo específicas diferentes generadas en la Segunda PCR logrará hibridar con el c-tag correspondiente sobre la superficie del *chip*. Si la muestra es heterocigoto, dos de las sondas lograran hibridar.

Figura 20. Imagen del Gene Chip y proceso de carga de las muestras.



- **Tinción y lavado del Chip:** Luego de realizada la hibridación se continua con el revelado o tinción y lavado del *chip* para eliminar restos del colorante, todo este proceso se realiza en la estación de fluidos (GeneChip® Fluidics Station), donde cada *chip* es lavado y preparado para su lectura en el escáner.

Figura 21. Proceso de lavado. Estación de fluidos GeneChip.



- Lectura del *Chip*: Durante esta etapa cada *chip* es colocado dentro del escáner GeneChip[®] 3000 7G 4C. Cada uno se lee de forma individual y los datos son recogidos en 4 archivos, uno para cada base o cada canal (A, T, C y G). Este escáner utiliza un láser para excitar el marcaje fluorescente de los fragmentos hibridados emitiendo luz de forma proporcional a la cantidad de ADN fijado en cada celda. De esta forma, se genera una imagen que será analizada posteriormente. Los datos son recopilados a partir de la emisión de luz en cuatro longitudes de ondas, uno para cada canal, que corresponde a cada base. La cantidad de luz emitida se recoge y se resta a la de fondo. Si la muestra es homocigoto, solo se observa luz en una longitud de onda, si es heterocigoto, será observada la lectura a dos diferentes longitudes de onda.

Posterior a la lectura en el escáner se utiliza el GeneChip Targeted Genotyping Analysis Software (GTGS), para la asignación de genotipos y verificación del control de calidad del genotipado en el *chip*. Según recomendaciones de Affymetrix, solo serán consideradas aquellas muestras o *chips* que cumplan con algunos criterios de control de calidad como; callrate % o tasa de éxito de genotipado de un ensayo que debe ser superior a un 80%, así como el Halfrate %, o porcentaje de ensayos que podrían ser genotipados y deben de ser menor al 10%, el ruido de fondo en cada canal de lectura del SNP no debe de ser superior al 20% y la variación entre el mismo control incluido en el análisis no debe superar el 30%. Si cualquiera de estos criterios no es cumplido, el experimento es marcado como fallido y sacado del análisis.

Esta lectura genera un archivo de texto con información sobre el ensayo, codificación de las muestras, genotipos, entre otras cosas. Este archivo fue llevado a una aplicación del Genotyping Data Filter v3.2.2 (<http://bioinformatics.cesga.es/gdf/>), para ser adaptado al archivo de entrada utilizado por el software Plink.

5.2 SNaPshot de los genes *TPMT* e *ITPA*

Los genes más frecuentemente relacionados con la farmacogenética de la AZA según la literatura son *TPMT* e *ITPA*. Sin embargo estos no se encuentran suficientemente cubiertos en el GeneChip Human 20K cSNP. Para la evaluación del gen *TPMT* se seleccionaron las variantes c.238G>C (rs1800462), c.460G>A (rs1800460) y c.719A>G (rs1142345), cuya presencia definen el alelo normal y los alelos de baja actividad enzimática documentados como más frecuentes en poblaciones caucásicas, *1, *2, *3A, *3B y *3C. Las variantes c.460G>A y c.719A>G están presentes de forma combinada y determinan el alelo *3A, mientras que los cambios c.460G>A, c.719A>G, y c.238G>C, de forma aislada definen los alelos *3B, *3C, y *2, respectivamente. En el alelo normal o salvaje (*1) no están presentes ninguno de estos cambios. En el gen *ITPA* se escogieron las variantes c.94C>A (rs3177087) e IVS2+21A>C (rs7270101), que se ha reportado disminuye la actividad enzimática entre un 30 y un 60% en cada caso.

El genotipado de estas variantes se llevó a cabo utilizando la técnica SNaPshot® Multiplex System, desarrollado por la casa comercial Applied Biosystems (AB Inc., Carlsbad, CA, USA), y que consiste en un método de mini-secuenciación de extensión de una base que permite analizar un gran número de SNPs de forma simultánea. Para esto, se diseñaron sondas de diferentes longitudes justamente adyacentes a la base anterior al SNP de estudio. El empleo del reactivo de SNaPshot, que incorpora en su mezcla de reacción bases sencillas modificadas y marcadas con fluoróforos, permite terminar la reacción de extensión de secuencia y marcar el fragmento de ADN que se está generando, haciendo posible la identificación del mismo mediante electroforesis capilar.

Desarrollo de la PCR Multiplex

El primer paso consistió en el desarrollo de una reacción de PCR, bajo formato multiplex, para lo cual se utilizaron las herramientas bioinformáticas **Primer3** versión 0.4.0 y **Autodimer**, para el diseño y selección de los iniciadores. Se escogieron aquellos que tuviesen una T_m teórica similar ($\pm 60^{\circ}\text{C}$), y, que al evaluar la complementariedad, se evitaran la formación de dímeros o estructuras secundarias durante el desarrollo de la técnica de PCR. En la Tabla 1, se pueden observar las características de los SNPs, iniciadores y amplicones analizados en este estudio en la PCR multiplex.

Tabla 1: Descripción de las variantes y diseño de los cebadores usados en la PCR Múltiplex.

| GEN | SNP | dbSNP | Cambio | TM (°C) | Tamaño amplicon (pb) | SECUENCIA (5'-3') |
|------|--------------|-----------|-----------|----------------|----------------------|--|
| TPMT | c.238 G>C | rs1800462 | Ala80Pro | 59.32 60.01 | 242 | F-TCTGAGTAAGAAAGATTCTGCTCTGT R- TCTGCTTTCCTGCATGTTCTT |
| | c.460G>A | rs1800460 | Ala154Thr | 58.83 59.96 | 380 | F-CAAAGCTAGTATTGGATTTAGGTTTT R- CCAGGTCCACACATTCCTCT |
| | c.719 A>G | rs1142345 | Tyr240Cys | 59.41 58.12 | 174 | F-CATCCATTACATTTTCAGGCTTT R-TCTTGAGAAGGTTGATGCTTTT |
| ITPA | c.94C>A | rs3177087 | Pro32Thr | 60.04 60.25 | 177 | F- CTCATTGGTGGGAAGAAGA R- CGAACTGCCTCCTGACATTT |
| | IVS2 + 21A>C | rs7270101 | - | 57.14 60.30 | 300 | F-CACATGGAGAATCACTAGATGG R-AGAGCAAGTGTTGGGACAAGG |

Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el QIAGEN Multiplex PCR Kit (Crawley, UK), en un termociclador DNA Engine Dyad® (MJ Research). El programa de amplificación utilizado se detalla a continuación en la tabla 2:

Tabla 2: Programa de amplificación de la PCR Múltiplex

| Paso | Estado | T/Cº | Tiempo |
|------|---------------------------|------|--------|
| 1 | Desnaturalización Inicial | 95 | 15' |
| 2 | Desnaturalización corta | 94 | 30'' |
| 3 | Anillado | 62 | 90'' |
| 4 | Extensión | 72 | 90'' |
| 5 | 35 ciclos desde el paso 2 | | |
| 6 | Extensión final | 72 | 10' |

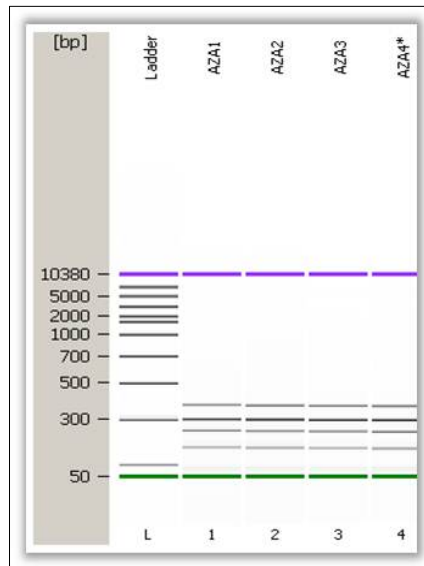
La mezcla de reacción quedó constituida de la siguiente manera:

Tabla 3: Reactivos y cantidades utilizadas en la PCR Múltiplex

| Componente | Volumen en Rx | Concentración Final |
|-------------------------------------|---------------|---------------------|
| 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix* | 5 µl | 1X |
| 10x primer mix, 2 µM de cada primer | 5 µl | 0.2 µM* |
| H ₂ O RNase-free | Variable | - |
| ADN | Variable | 100ng/uL |

Se obtuvieron 5 fragmentos que se verificaron utilizando el sistema de electroforesis capilar Agilent DNA 7500 Kit, como podemos observar en la siguiente figura:

Figura 22. Electroforesis capilar de los productos de la PCR multiplex.



*Nota: Debido a la superposición de los amplicones se observan solo 4 bandas bien diferenciadas

Purificación del Producto Amplificado

Luego de la PCR el producto amplificado se sometió a una reacción de purificación con el reactivo EXOSAP-IT® de USB, con el objetivo de eliminar los residuos monocatenarios de los cebadores o de cualquier otro ADN producido en la PCR, al igual que los dinucleótidos (dNTPs) sobrantes. El EXOSAP-IT consigue preparar el ADN amplificado para una mejor secuenciación y está compuesto por dos enzimas hidrolíticas; exonucleasa I recombinante y fosfatasa alcalina de camarón. Para esto las cantidades utilizadas fueron 1 µL de producto amplificado y 0,5 µL de exosap-it. Se incubó a 37°C durante 15 minutos (fase de tratamiento) y posteriormente a 80°C otros 15 minutos (fase de inactivación de la enzima), en un termociclador.

Desarrollo de la metodología del SNaPshot

Para la reacción de SNaPshot se utilizan los siguientes reactivos en las proporciones indicadas, modificadas de las recomendaciones de la casa comercial AB:

Tabla 4: Reactivos usados en la reacción de SNaPshot

| Componente | Volumen en Rx |
|--------------------------------------|---------------|
| Producto Amplificado y purificado | 1.5 µL |
| Reactivo SNaPshot Master mix | 2,5 µL |
| Pool de sondas, 0,2 µM de cada sonda | 2,5 µL |
| H ₂ O RNase-free | 0.5 µL |

y el protocolo de secuenciación fue el siguiente:

Tabla 5: Programa de secuenciación usado en la reacción de SNaPshot

| Paso | Estado | T/Cº | Tiempo |
|-----------|---------------------------|------|--------|
| 1 | Desnaturalización Inicial | 96 | 10'' |
| 2 | Desnaturalización corta | 50 | 5'' |
| 3 | Anillado | 60 | 30'' |
| 25 ciclos | | | |

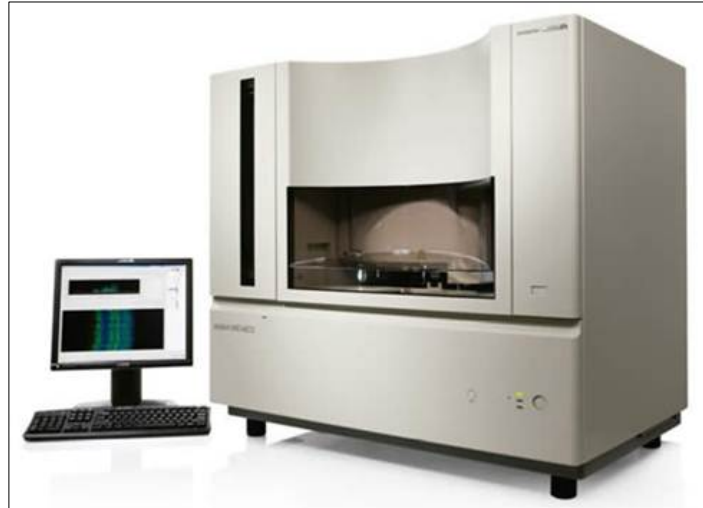
Purificación del Producto de SNaPshot

Posterior a la reacción de mini-secuenciación y previo al montaje en el equipo de electroforesis capilar, es necesario un proceso de purificación enzimática para eliminar los nucleótidos marcados que no fueron utilizados durante la reacción. Para ello se utilizó la enzima SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*), que cataliza la defosforilación 5' fosfato de los extremos del ADN amplificado. Las cantidades utilizadas fueron: 0.5 µL del producto de SNaPshot más 1 µL de SAP (1U/µL), los cuales se incubaron a 37°C durante 60 minutos de tratamiento y 15 minutos a 75°C para la inactivación de la enzima en termociclador.

Montaje en el equipo Abi 3730XL

Los productos anteriormente obtenidos se prepararon para la electroforesis en el secuenciador ABI 3730 mezclándolos con 9 µL de High-Dy Formamida (AB) y 0.5 µL del marcador de peso molecular Genescan Liz120 (AB), desnaturalizando durante 5 minutos a 96º C, y enfriados a 4º C durante otros 5 minutos antes de ser cargados en el equipo.

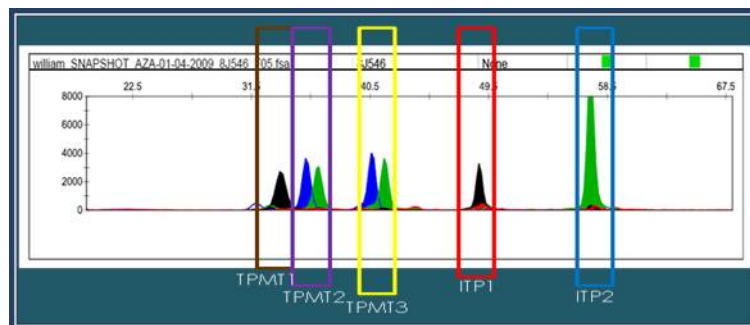
Figura 23. Imagen del equipo secuenciador de ácidos nucleicos ABI 3730xl.



Análisis de los SNPs en el Equipo

Para el análisis de los fragmentos marcados se utilizó un protocolo de electroforesis para SNaPshot en el Abi 3730XL, usando POP7 de AB (Polímero diseñado para electroforesis capilar de fragmentos largos y de forma rápida). Los alelos fueron determinados automáticamente mediante la creación de un panel de análisis con el programa *Gene Mapper* 0.37 de AB y comprobados de forma manual uno por uno, como se observa en el ejemplo de la figura 24.

Figura 24. Imagen de los electroferogramas generados en el análisis de SNaPshot.



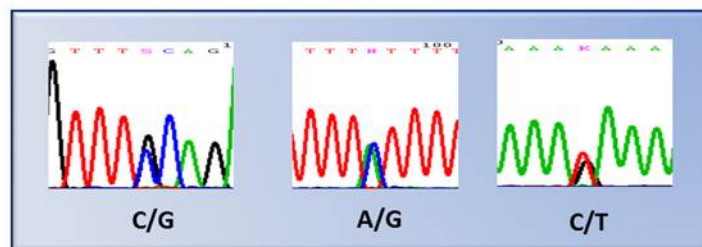
*Variantes en el gen *TPMT*; TPMT 1: c.238G>A, TPMT2: c.460G>A, TPMT3: c.719A>G

*Variantes en el gen *ITPA*; ITP1: c.94C>A, ITP2: IVS2+21A>C

Control de Calidad

Para verificar la exactitud de los resultados generados por esta metodología se realizaron amplificaciones separadas de las mismas muestras en diferentes ocasiones y los resultados fueron corroborados por secuenciación bidireccional utilizando el BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AB), como se muestra en la siguiente figura.

Figura 25. Electroferograma de las variantes analizadas.



5.3 MALDI-TOF-MS

Para la réplica de los resultados obtenidos en el primer ensayo de GWAS se empleó la técnica de genotipado MALDI-TOF basado en espectrometría de masas.

La tecnología iPLEX GOLD de Sequenom está diseñada para el genotipado de un número alto de muestras, en placas de 96 y 384 pocillos, y la transferencia de muestras y reactivos está robotizada. Las reacciones para el procesamiento de las muestras se llevan a cabo en termocicladores duales de 384 pocillos, lo que permite un alto grado de multiplexado.

Sequenom utiliza dos reacciones: una de amplificación de los fragmentos que contienen uno o varios de los polimorfismos de interés y otra de extensión de una sola base a partir de una sonda. Debido a esto los diseños de Sequenom para cada polimorfismo consisten en un fragmento con la base a tipar y unos 100 pares de bases a cada lado. Un software especial comprobará los posibles iniciadores de PCR y las posibles sondas necesarias para genotipar el polimorfismo. Tras el análisis de los ensayos propuestos el software descarta aquellos SNPs que no se pueden genotipar debido a las características de las regiones contiguas (bien sea por la presencia de otros SNPs, bien por la naturaleza de la secuencia que puede dificultar e incluso

impedir la correcta unión de la sonda). En la réplica se incluyeron únicamente las variantes para las que se pudieron realizar diseños viables.

El protocolo de amplificación por PCR se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante: la cantidad de ADN de partida es de 40 ng; se trabaja con 1X PCR buffer (2mM), MgCl₂ (2mM), dNTPs 500 microM, 100 nM de cada iniciador o primer de PCR y 0.5U de polimerasa HotStar Taq. En las reacciones de más de 27 variantes la cantidad de enzima es el doble, es decir 1U. El volumen final de reacción es de 5 microl.

El protocolo consiste en 1 ciclo de 4 minutos a 94°C; 45 ciclos de 20 segundos a 94°C; 30 segundos a 56°C y 1 minuto a 72°C; por último 1 ciclo de 3 minutos a 72°C. Tras la PCR se elimina el exceso de dNTPs que no se han incorporado en la PCR mediante su defosforilación a través de un tratamiento enzimático con SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). El volumen final de la reacción con SAP es de 7µL, que incluyen los 5µL de producto de PCR, 0.3 U de enzima SAP y 10X SAP Buffer. La reacción se incubó en un termociclador a 37°C durante 40 minutos seguido de una segunda incubación de 5 minutos a 85°C.

A continuación se lleva a cabo la reacción iPLEX. El volumen de reacción es de 9µL: 10X del tampón iPLEX Buffer, 1X de la mezcla de extensión iPLEX extensión mix, 7 microM y 14 microM de la mezcla de iniciadores (doble concentración en los iniciadores high mass con respecto a los low mass) y 1X de termosecuencia, la enzima con que se lleva a cabo la reacción de extensión.

La tecnología iPLEX Gold presenta dos variantes en función del grado de multiplex; así, el grado de multiplex bajo (low mass) permite el genotipado de entre 1-18 variantes por reacción mientras que el de grado alto (high mass) permite el genotipado de entre 19 y 36 variantes genéticas por reacción. En los ensayos de más de 18 variantes genéticas además de la enzima también se duplica el volumen de la mezcla de terminación de iPLEX.

El termociclador se programa en siete pasos, que se muestran a continuación:

Tabla 6. Programa de amplificación de la iPLEX.

| Paso | T/Cº | Tiempo |
|------|---------------------|--------|
| 1 | 94 | 30'' |
| 2 | 94 | 5'' |
| 3 | 52 | 5'' |
| 4 | 80 | 5'' |
| 5 | 4 ciclos al paso 3 | |
| 6 | 39 ciclos al paso 2 | |
| 7 | 72 | 3' |

En la reacción de extensión, el iniciador hibrida una base previa al locus en estudio. El genotipado de la muestra se lleva a cabo por la adición de un ddNTP al iniciador de extensión, que será complementario a la base en estudio. Este ddNTP está modificado en masa tal y como se muestra en la tabla 7 a fin de aumentar la diferencia en masa entre las diferentes secuencias extendidas. El cebador de extensión es una base más larga tras la reacción de extensión. Esta base le confiere una masa determinada, que será detectado por el espectrofotómetro MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) que registra el tiempo de vuel (Time OF Flight) del producto de extensión en el interior de una columna de vacío, tiempo que asocia a una masa que, a su vez, será asociada a un genotipo.

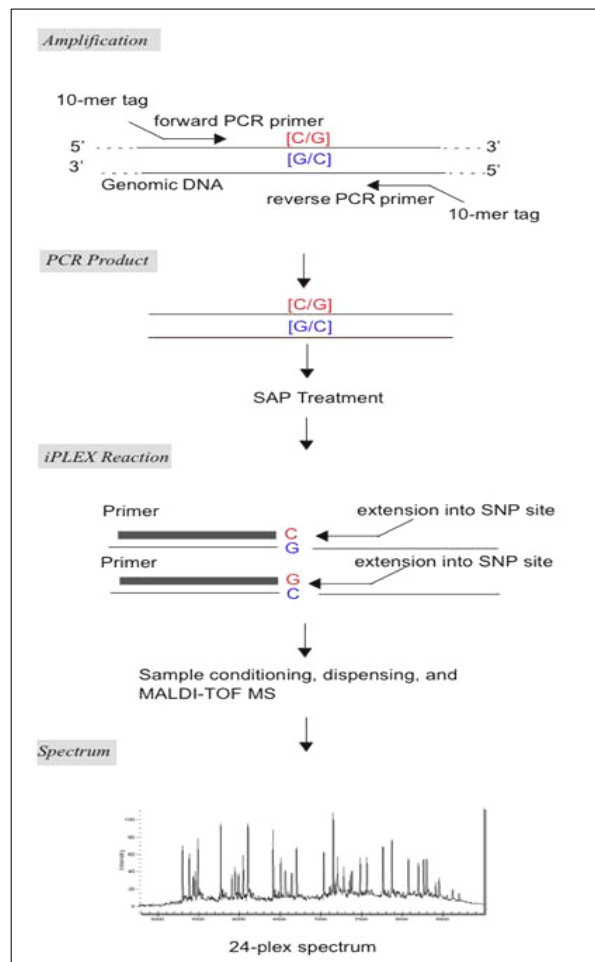
Tabla 7. Variaciones en masa de los ddNTPs para SBE-Sequenom MassARRAY® System.

| | Diferencia en Masas (Da) | | | | | |
|-----------------|--------------------------|----------------------|---------|----------|---------|--------|
| | Masa original (Da) | Masa modificada (Da) | Adenina | Citosina | Guanina | Timina |
| Adenina | 313.2 | 360.1 | - | 24 | -16 | -55.9 |
| Citosina | 289.2 | 384.1 | -24 | - | -40 | -79.9 |
| Guanina | 329.2 | 344.1 | 16 | 40 | - | -39.9 |
| Timina | 304.2 | 304.2 | 55.9 | 79.9 | 39.9 | - |

Farmacogenómica del AZA
Material y Métodos

Tras la reacción de extensión se añade una resina para limpiar las sales del producto de la reacción iPLEX a fin de optimizar el análisis. Después se dispensa la placa de 384 pocillos en un Spectro CHIP bioarray delante el Mass ARRAY Nanodispenser (Sequenom, Inc). Como se señaló, la diferencia en masa tras la reacción de iPLEX es detectada por medio de matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF), que permite llevar a cabo el genotipado automáticamente. El programa de análisis Typeranalyzer v4.0.2 (Sequenom, Inc) identifica los picos de acuerdo a las masas esperadas y asigna un genotipo. En la figura 26 se muestra de forma esquematizada la reacción de genotipado iPLEX.

Figura 26. Desarrollo secuencial esquematizado del genotipado usando la plataforma sequenom (iPLEX).



Las variantes analizadas se encuentran en el anexo 3 (Apartado de Anexos). Todas estas posiciones hacen referencia a la versión b126 de dbSNP. Se diseñaron 4 ensayos ("Plexes"), W1 donde se estudiaron 35 polimorfismos, W2 con 31 polimorfismos, W3 para 18 polimorfismos y W4 con 3 polimorfismos. Los detalles de la identificación de cada SNP y los iniciadores utilizados en estas reacciones se presentan en el cuadro del anexo 4 en el apartado de Anexos.

6. Análisis estadístico

Los principales análisis en esta sección fueron desarrollados con el software Plink, versión 1.06 y el programa estadístico PASW Statistics 18.0 y la librería SNPassoc de R (133). Para identificar SNPs significativamente relacionados con la eficacia y/o toxicidad al tratamiento con AZA, hemos desarrollado un análisis de asociación por comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles.

En nuestro análisis de asociación alélica hemos utilizado la prueba básica de X^2 , salvo en las oportunidades en las que el número de observaciones en alguna celda en las tablas de contingencia era menor de 5, en cuyo caso se utilizó el test exacto de Fisher. Igualmente, para evitar el problema de la baja frecuencia de los homocigotos raros, se realizó un análisis genotípico asumiendo el modelo dominante, que agrupa los individuos heterocigotos y homocigotos raros y los compara con el grupo de los homocigotos frecuentes.

6.1 Análisis estadístico en el estudio del Genoma Completo

Se consideró un valor de p para significación estadística de 10^{-6} , para el análisis de genoma completo equivalente a un ajuste de Bonferroni para un valor de p de 0.05 asumiendo aproximadamente 11.500 ensayos, como los realizados en este análisis. En base a esto, se definieron dos categorías de importancia para la selección de los SNPs. Aquellos con valores de $p \leq 10^{-6}$ se consideraron como estadísticamente significativos, mientras que los SNPs con valores de p entre 10^{-5} y 10^{-3} fueron considerados como sugerentes de relevancia estadística.

Igualmente, es necesario mencionar que para la evaluación del estudio de genoma completo, nos hemos centrado en investigar por un lado la eficacia al tratamiento con AZA, y por otro, el desarrollo de efectos adversos desde un punto de vista global y dentro de éstos, hemos decidido analizar la mielosupresión y la pancreatitis, debido principalmente a razones estadísticas relacionadas con el número de pacientes disponibles para el estudio y por considerarlos fenotipos más concretos a la hora de caracterizar cada grupo en casos y controles.

Para la visualización gráfica de los resultados de asociación entre las categorías de análisis y los SNPs a lo largo del genoma se construyeron graficas del tipo Manhattan Plots utilizando el programa Haploview, versión 4.2. La evaluación de la subestructuración poblacional

se hizo utilizando el software STRUCTURE (versión 2.3.1), y para el cálculo y visualización de los QQ-plots se usó el programa GWAViwer.

6.2 Análisis estadístico en el estudio de los genes *TPMT* e *ITPA*

La valoración estadística entre las variantes en los genes *TPMT* e *ITPA* y su relación con el desarrollo de EA y la respuesta al fármaco (eficacia), se realizó utilizando el programa G-Stat 2.0 (<http://www.e-biometria.com/g-stat/index.html>). Para ello se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas, se utilizó el test exacto de Fisher y se calcularon los Odds Ratio con un 95% de intervalo de confianza, entre los grupos analizados, como medida de estimación de riesgo al confrontar las variables. Para todas las estimaciones realizadas se consideró como significativo estadísticamente un valor de $p < 0.05$.

6.3 Análisis de asociación en el estudio del GWAS ajustado por covariables

El análisis de asociación global se realizó bajo diferentes planteamientos. En el primero se consideró el efecto del SNP de forma singular, y posteriormente en un segundo caso también se evaluó la asociación para cada SNP controlando el posible efecto de algunas covariables clínicas y del paciente, como edad, sexo, tipo de EII, tabaquismo, antecedentes familiares y genotipos en *TPMT* e *ITPA*. Tanto en el estudio del genoma completo como cuando se realizó la valoración de los genes *TPMT* e *ITPA*.

6.4 Análisis Estadístico en el estudio de la Replica:

Para la confirmación de resultados fueron seleccionados un grupo de SNPs que cumplieron un criterio de *significación estadística* o *sugerentes de significación estadística* en cada una de las categorías seleccionadas. El genotipado se realizó por medio de la plataforma de Sequenom MassArray distribuidos en 4 reacciones distintas y la evaluación estadística con el programa PASW Statistics 19.0 y R.

Igualmente se utilizó la prueba del χ^2 o el test exacto de Fisher cuando fue necesario si había un valor menor a 5 en la tabla de contingencia, para estimar la diferencia de frecuencias alélicas entre casos y controles y así obtener un valor de significación estadística. Adicionalmente se estimó la probabilidad conjunta a manera de meta-análisis, al unir la información de las dos cohortes de pacientes, la inicial y la de la réplica utilizando el estadístico CMH (Cochran-Mantel-Haenszel), que calcula una probabilidad y un OR combinada con los dos niveles considerados.

IV. Resultados

A. Estudio de asociación de genoma completo.

1. La población de estudio.

En el presente trabajo se reflejan los resultados de un estudio multicéntrico donde se ha explorado la farmacogenómica del tratamiento con AZA en un grupo de pacientes con EII.

En la etapa inicial se realizó un estudio de asociación del genoma completo analizando concretamente la fracción codificante del genoma humano, con el objetivo de hallar posibles variantes genéticas nuevas relacionadas con la diversidad interindividual de respuesta al fármaco. Se trata además, según nuestro conocimiento, de la primera vez que se aplica el análisis de variantes codificante a la farmacogenómica, y en concreto de la AZA. Entre estas variantes hemos incluido las de los dos genes implicados en el metabolismo del AZA, el *TPMT* y el *ITPA*, previamente relacionados con la respuesta del individuo a la acción de este fármaco.

Los resultados obtenidos fueron replicados en un grupo independiente de pacientes con EII, con características similares al grupo inicial que igualmente recibieron AZA como tratamiento.

Los datos demográficos de los individuos reclutados en el primer estudio se encuentran resumidos en la tabla 8. Se incluyeron en el análisis un total de 233 pacientes con EII que recibieron AZA, residentes en la Comunidad de Galicia y evaluados clínicamente por miembros del grupo EIGA, procedentes de cuatro hospitales de la comunidad gallega.

El 66.95% y el 33.05% de los pacientes presentaron EC y CU, respectivamente. La distribución entre hombres y mujeres fue similar (116-117), y la edad promedio fue de 39 años, con una mínima de 8 y una máxima de 70 años. El 84.55% no refirió antecedentes familiares, contra un 7.72% que si lo presentaban y en 18 pacientes no pudo ser determinado. Todos los pacientes recibieron AZA en dosis que variaron desde 1,5-3mg/kg-día (dosis estándar recomendada), de ellos, el 79.64% respondieron favorablemente al fármaco, mientras que el 20.36% no respondieron. El tiempo medio de tratamiento fue de 25.54 meses. Y en relación a la toxicidad; 32.62% de los pacientes presentaron diversos EA al tratamiento, entre estos, el más frecuente fue la pancreatitis (19/76), seguido por la Intolerancia digestiva (16/76), la mielosupresión (15/76), la reacción cutánea (13/76), luego la hepatotoxicidad y las artralgias con igual número de casos (6/76) y, por último, un solo caso de alopecia (1/76).

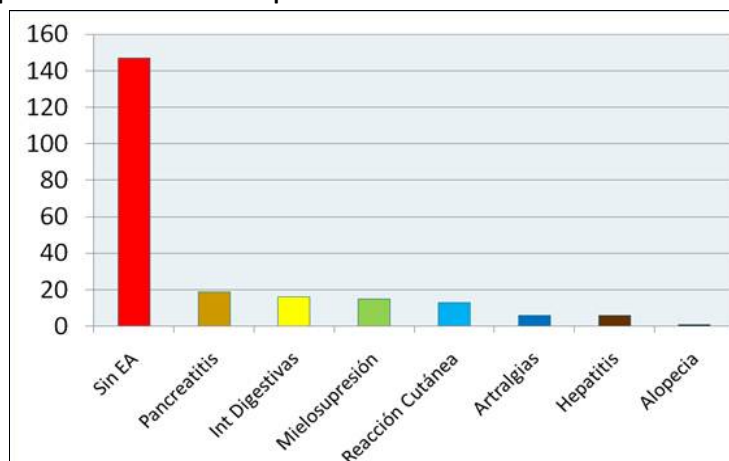
Tabla 8. Datos demográficos de los pacientes tratados con AZA incluidos en el estudio. Población inicial.

| Categoría | n (233) | % |
|---|--------------------|-------|
| Diagnóstico | | |
| Enfermedad de Crohn | 156 | 66.95 |
| Colitis Ulcerosa | 77 | 33.05 |
| Sexo | | |
| Masculino | 116 | 49,79 |
| Femenino | 117 | 50,21 |
| Edad | | |
| Promedio (Años) | 39 (8-70) | 100 |
| <16 | 7 | 3.00 |
| 17-40 | 161 | 69.10 |
| > 40 | 65 | 27.90 |
| Antecedentes familiares | | |
| Sí | 18 | 7.72 |
| No | 197 | 84.55 |
| ND* | 18 | 7.72 |
| Fumador | | |
| Sí | 80 | 34.55 |
| No | 134 | 57.73 |
| ND* | 18 | 7.72 |
| Dosis media de AZA (mg/kg/día[rango]) | 2.32 [1,5-3] | - |
| Tiempo de tratamiento (meses[rango]) | 25.54 [0,33-86] | - |
| Respuesta a AZA | | |
| No respondedores | 34 | 20.36 |
| Respondedores | 133 | 79.64 |
| Indeterminados | 66 | - |
| Efectos Adversos | | |
| No | 157 | 67.38 |
| Sí | 76 | 32.62 |
| Tipo de Efecto Adverso | | |
| Pancreatitis | 19 | 8.15 |
| Intolerancia Digestiva | 16 | 6.87 |
| Mielosupresión | 15 | 6.44 |
| Reacción cutánea | 13 | 5.58 |
| Hepatotoxicidad | 6 | 2.58 |
| Artralgias | 6 | 2.58 |
| Alopecia | 1 | 0.43 |

*ND. No Determinado

En la siguiente figura se puede apreciar de forma gráfica la relación de la toxicidad a la AZA en los pacientes de este estudio.

Figura 27. Distribución de los Efectos Adversos presentados en los pacientes recibiendo Azatioprina incluidos en este estudio. Población inicial.



En términos generales, los EA ante la AZA observados en los pacientes que constituyen nuestra población inicial es comparable a la reportada previamente en otras poblaciones de pacientes con EII tratados con AZA (15,134,135): pancreatitis, intolerancia gastrointestinal, mielosupresión, reacción cutánea, hepatotoxicidad, artralgia y alopecia. Todos los EA fueron moderados o graves, con una recuperación completa luego de la retirada del fármaco o de un ajuste de la dosis en algunos pacientes. En el caso de la eficacia, en nuestro grupo se observó que cerca del 21% de los pacientes no respondió a la acción esperada del fármaco, igualmente esta cifra se asemeja en la reportada en la literatura para otros grupos de pacientes.

2. Control de Calidad del estudio de asociación de exoma completo

Para asegurar la calidad en el resultado del GWAS, se realizó un estricto control de calidad sobre los datos del genotipado del *chip*, tanto sobre los marcadores del tipo SNP como a cada una de las muestras analizadas. De los 19217 SNPs codificantes que incorpora el Affymetrix GeneChip Human 20KcSNP, entre 11600 y 11700 pasaron los controles de calidad y fueron utilizados para los análisis posteriores.

En relación a los SNPs, por tener una eficiencia en el genotipado <80% se eliminaron entre 1,851-2,000, por tener una Frecuencia Alélica Mínima (MAF) menor al 1%, entre 5,293-5,380, y por no cumplir con el Equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.001$) en los controles fueron eliminados entre 112 y 211 SNPs. Con relación a las muestras, al hacer el control del sexo fenotípico con el molecular dos individuos del grupo de controles presentaron discordancias y correspondían a un grupo de tres (3) del grupo control que fueron excluidos de los análisis por

tener más del 10% de genotipos no asignados. Un solo individuo no logró ser genotipado. El control de calidad fue desarrollado con el programa PLINK versión 1.03, y un resumen del mismo se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 9. Esquema de trabajo del control de calidad para muestras y SNPs posterior al estudio del GWAS.

| Clases de estudio | Números de marcadores y muestras al Inicio | Control de calidad en marcadores | | | Control de calidad en muestras | Números de marcadores y muestras al Final |
|---------------------------|--|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| | | Filtro 1 GENO 0.2 | Filtro 2 MAF <0.01 | Filtro 3 HWE < 0.001 | Filtro 4 MIND 0.2 | |
| | | excluidos | excluidos | excluidos | excluidos | |
| Efectos adversos globales | SNPs (19217) | 1865 | 5338 | 119 | - | 11895 |
| | Casos (74) | - | - | - | - | 74 |
| | Controles (94) | - | - | - | 3 | 91 |
| Pancreatitis | SNPs (19217) | 1933 | 5313 | 209 | - | 11762 |
| | Casos (19) | - | - | - | - | 19 |
| | Controles (157) | - | - | - | 3 | 154 |
| Mielosupresión | SNPs (19217) | 2015 | 5380 | 112 | - | 11710 |
| | Casos (14) | - | - | - | - | 14 |
| | Controles (94) | - | - | - | 2 | 92 |
| Eficacia | SNPs (19217) | 1995 | 5323 | 157 | - | 11666 |
| | Casos (34) | - | - | - | 1 | 33 |
| | Controles (132) | - | - | - | 2 | 130 |

Tras el control de calidad quedaron disponibles para el estudio de asociación entre 11666 y 11895 SNPs codificantes, según el caso, distribuidos a lo largo de todos los cromosomas. Con relación a la selección de los integrantes de los grupos de casos y controles, los mismos quedaron conformados como 74 casos y 91 controles para los EA globales, 19 casos y 154 controles para la pancreatitis, 14 casos y 92 controles para la mielosupresión y 33 casos y 130 controles para la evaluación de la eficacia del fármaco. Dicha selección de casos y controles estuvo principalmente definida por el tiempo de exposición al fármaco en cada grupo estudiado así como la presencia o no del efecto analizado.

3. Estratificación poblacional.

Como parte del control de calidad en un estudio de genoma completo, se recomienda evaluar la presencia de sub-estructuración poblacional dentro del grupo estudiado con el objetivo de minimizar la tasa de falsos positivos relacionados más a diferencias reales entre las

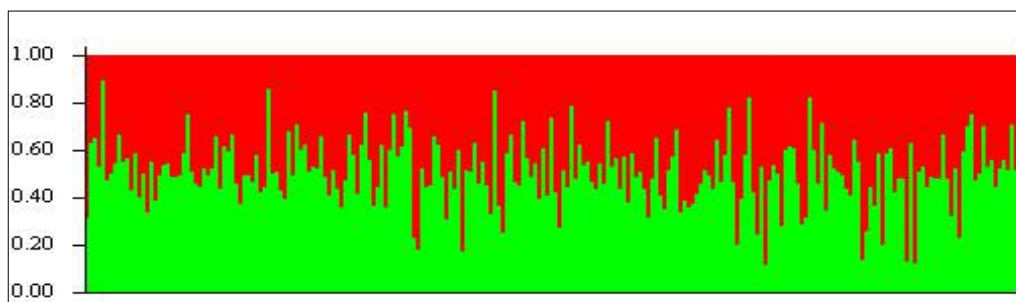
frecuencias alélicas de la población estudiada atribuibles a variaciones naturales en su acervo genético que a las propias esperadas a estar relacionadas con el fenotipo en estudio (136).

Esta característica es de suma importancia en el estudio de enfermedades complejas y más aún en estudios de asociación masivos realizados mediante el genotipado de gran cantidad de SNPs a lo largo de todo el genoma, donde muchas veces, de existir subestructuración, la misma no podría definirse solamente con la recopilación de los datos demográficos de los participantes, y que de no detectarse y corregirse podría afectar en gran manera la interpretación del resultado generado, ya sea por la aparición de falsos positivos o también disminuyendo el poder del estudio o el efecto de alguna variable real.

En nuestro caso, este análisis se realizó utilizando el software STRUCTURE (versión 2.3.1)(137), el cual utiliza un algoritmo que permite comparar las frecuencias alélicas entre las poblaciones pre-definidas (los casos y los controles), y estima el grado de homogeneidad entre ellas.

En la siguiente gráfica se presenta el resultado del análisis donde se puede observar que no existen diferencias significativas entre las dos poblaciones consideradas como casos y controles. Cada línea vertical representa a un individuo, el cual a su vez se encuentra fragmentado en dos colores representando cada uno la estimación del grado de pertenencia o semejanza del mismo entre las poblaciones establecidas.

Figura 28. Cluster plots de casos y controles utilizando STRUCTURE. Comparación alélica en el estudio de la estratificación poblacional. El rojo corresponde al componente de los casos y el verde a los controles.



Igualmente, en la siguiente tabla podemos observar la estimación del componente de cada uno de los grupos estudiados (casos y controles), en cada uno de los grupos inferidos. Pudiéndose ver que existe prácticamente una distribución similar de frecuencias entre los casos y los controles, demostrando así su homogeneidad.

Tabla 10. Probabilidades de cada componente ancestral en casos y en controles.

| Comparación | Grupos inferidos | | Número de individuos |
|-------------|------------------|-------|----------------------|
| | 1 | 2 | |
| Población | | | |
| Controles | 0.495 | 0.505 | 157 |
| Casos | 0.482 | 0.518 | 74 |

En conclusión, no se observó diferencia significativa entre los casos y controles, así que no fue necesario corregir por estratificación durante el análisis de asociación. En este sentido, solamente al inicio del estudio, un individuo fue excluido por haber reportado no tener ascendencia Europea.

4. Gráficas quantile-quantile, “QQ-plots” y Manhattan plots.

Una de las principales implicaciones de los estudios de genomas completos radica en la realización de muchos ensayos al mismo tiempo (entre miles y millones), y simplemente por azar, se esperará una cantidad considerable de falsos positivos. Varias estrategias han sido postuladas para abordar este asunto. Una de ellas, en parte es el desarrollo de gráficas “**Quantile-Quantile plot**”.

Estas gráficas, en el contexto de estudios de genomas completos, muestran un resumen visual de la distribución de las probabilidades de las pruebas estadísticas aplicadas en el GWAS (usualmente un X^2), mostrando una distribución “normal” al comparar la distribución observada con la esperada teóricamente. Ambas informaciones son confrontadas en un sistema de coordenadas y generaran una línea de pendiente 1, llamada también línea de identidad, que servirá como referencia para la comparación con los datos reales. Los valores obtenidos a partir del método estadístico empleado, ya sea el X^2 u otro, son representados como valores \log_{10} , por ejemplo, y son clasificados en orden de menor a mayor en el eje “y” se traza contra él la distribución que se espera bajo la hipótesis nula de no asociación en el eje “x”. Las desviaciones de la línea de identidad pueden indicar que la distribución asumida es incorrecta posiblemente debida a la presencia de falsos positivos o por el contrario que la muestra contiene valores que surgen como consecuencia de una asociación real y que se espera se separen de la normalidad en el extremo superior de la línea de identidad y que se corresponderían con posibles asociaciones verdaderas.

Entre otras cosas, este tipo de pruebas ayuda a identificar si el estudio en sí ha generado mucho más resultados significativos que los esperados por azar (138). Además, se evalúa el número y la magnitud de las asociaciones observadas entre un SNP en particular y la enfermedad o el rasgo en estudio, basándose en dicha comparación entre lo observado y lo esperado bajo la

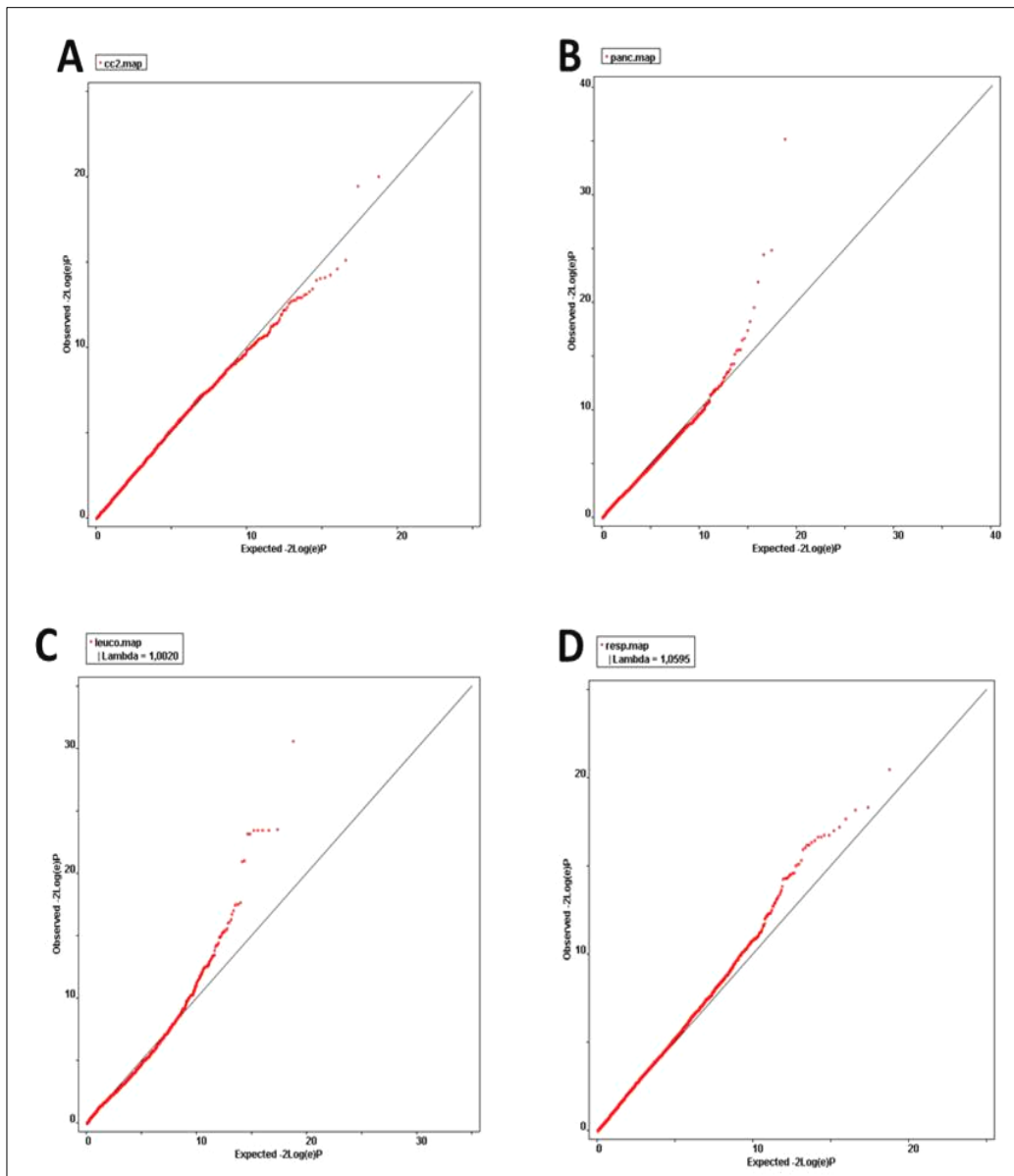
hipótesis nula de no asociación (125). Al mismo tiempo, aunque no es su objetivo principal, en estas gráficas es posible mirar de forma indirecta la probable presencia de subestructuración poblacional, de existir se puede observar la tendencia de algunos SNPs que pueden estar influenciados por dicho fenómeno. Cuando emerge una diferencia muy marcada, como una tendencia a la separación entre los puntos confluentes entre lo observado y lo esperado principalmente desde el inicio de la línea de identidad que seguiría hasta el final, es necesario considerar la presencia de estratificación poblacional (138,139).

En nuestro caso, hemos utilizado el software WGAViewer, el cual presenta entre sus aplicaciones una herramienta para el cálculo y valoración de los QQ-Plots. Las gráficas generadas muestran los datos de la prueba de χ^2 expresados como el $-2 \log(e)$ del valor de p , con el valor esperado en el eje horizontal y el observado en el eje vertical.

Al analizar las gráficas obtenidas en nuestro estudio se puede observar y se confirma por un lado, que no hay efecto apreciable de subestructuración poblacional entre las muestras analizadas que pueda estar influenciando la distribución o significación estadística de los SNPs considerados en cada análisis, puesto que se aprecia una distribución homogénea entre los valores observados y los esperados en cada una de las clases de análisis estudiadas como EA globales, pancreatitis, mielosupresión y la eficacia, y al no observarse una separación importante entre los valores observados y esperados a lo largo de la línea de confrontación de hipótesis o línea de identidad.

En este mismo sentido, el programa estima un valor lambda para cuantificar los efectos de la estratificación de la población asumiendo una distribución χ^2 con 2 grados de libertad $2\log(e)p$ (138). Característica que es útil para confirmar que los métodos utilizados para la evaluación de la estratificación han sido ejecutados correctamente. En nuestro caso para las clases estudiadas los valores lambdas obtenidas van desde 1.0020 en mielosupresión hasta 1.0595 en la evaluación de la eficacia (Fig.29,A-D). Resultados que indican y corroboran que la estratificación poblacional en nuestro grupo de análisis es mínima y sin repercusiones importantes en los resultados finales.

Figura 29. Gráficas Quantile-Quantile del GWAS para: A) Efectos adversos globales, B) Pancreatitis, C) Mielosupresión y D) Eficacia. Se presentan el Log negativo de valores de p del análisis de X2, en el eje de las X los valores esperados, y en el eje de la Y los valores Observados.



Por otro lado, también puede notarse que los valores de probabilidades de los SNPs analizados siguen la distribución esperada bajo la hipótesis nula indicada por la línea diagonal. En

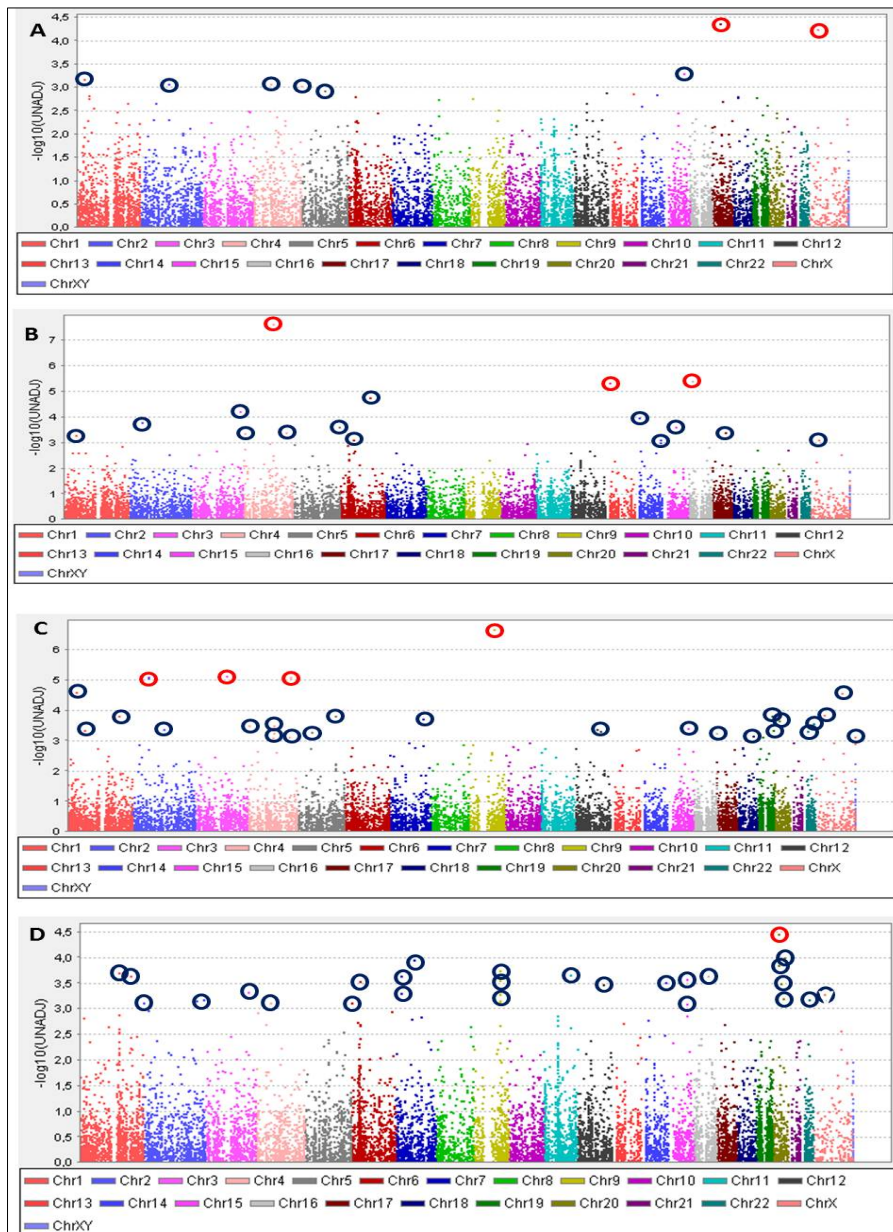
cada caso de análisis puede observarse un pequeño grupo de SNPs en la región más distal de la línea que se separan a diferentes medidas de la distribución esperada, desviándose un poco de esta línea diagonal, independientemente del valor de p nominal en cada caso.

Las desviaciones de las gráficas B, C y D se podrían deber al efecto de SNPs efectivamente asociados con el fenotipo; en la gráfica A, se observa sin embargo la falta de poder debida al número pequeño de muestras, lo cual es evidente al ver los valores de p que salen por debajo de la diagonal (Fig. 29).

Ahora bien, en el siguiente diagrama (Fig. 30, Manhattan plots), se puede observar la distribución de los SNPs y su significación estadística para el análisis de X^2 , en una visión detallada por cromosoma del genoma completo. En un *Manhattan Plots*, que es un tipo de gráfico de dispersión, el cual se utiliza generalmente para mostrar los datos con un gran número de puntos de datos y con una distribución de valores de mayor magnitud. Cada punto representa el valor de p en escala logarítmica en el eje vertical, y la posición genómica en el eje horizontal. En nuestro caso utilizamos el software haploview versión 4.2 para la creación de los mismos.

En el análisis de los EA globales (Fig. 30-A), se puede notar varios SNPs importantes en los cromosomas 17, X, y en el 15, 2 y 4. En el caso de la pancreatitis (Fig. 30- B), llaman la atención SNPs en el cromosoma 4, en el 16, y el 13, y en menor grado en el cromosoma 6 y 3 con otro grupo distribuidos en los cromosomas 14, 2, 15, 5, 4, 17, 4, 1, 14, 23 y 6. Al visualizar los resultados del análisis de la mielosupresión, igualmente, se pueden observar varios SNPs significativos, uno en particular en el cromosoma 9 seguido de otros en los cromosomas 3, 2, y 4, y por último otros en los cromosomas 1, 2, 3, 23, 19, 5, 1, 7 (Fig. 30-C). Para la eficacia al tratamiento (Fig. 30-D), se observan señales importantes de SNPs en los cromosomas 20, 7, 1, 6, 9 y otros con menor intensidad en los cromosomas 16, 11, 15, 12, 3, 23, y 14.

Figura 30. Estudio de asociación genética de genoma completo, GWAS (Manhattan Plots) para: A) Efectos adversos globales, B) Pancreatitis, C) Mielosupresión y D) Eficacia. Se representa Log negativo de valores de p del análisis de X2. Se denotan en círculos naranja los SNPs con valores inferiores a 10^{-6} (estadísticamente significativos), mientras que los SNPs con valores entre 10^{-3} y 10^{-5} se marcan en círculos azules (sugeres de relevancia estadística).



A partir de los resultados iniciales de las pruebas de asociación y la visualización en los gráficos anteriores se procedió a seleccionar al azar algunos SNPs para ser verificados de forma individual por medio de la secuenciación bidireccional, en este apartado se seleccionaron alrededor de 4 o 5 SNPs para cada categoría y tras analizarlos se verificó que había para un SNP en particular entre los escogidos incongruencias entre el genotipo reportado por el *chip* y el observado en la secuenciación, por lo que se consideró como un artefacto de la técnica de genotipado del *chip*. Tal es el caso de un SNP (rs17007988) ubicado en el cromosoma 4 en el caso de la pancreatitis. El resto de los SNPs seleccionados coincidió su genotipo en ambas técnicas empleadas.

5. Pruebas de asociación del estudio de genoma completo

Para la evaluación del estudio de genoma completo, como se mencionó anteriormente nos hemos centrado en investigar por un lado la eficacia al tratamiento con AZA, y por otro el desarrollo de EA desde un punto de vista global, y dentro de éstos, hemos decidido analizar la mielosupresión y la pancreatitis, debido principalmente a razones estadísticas relacionadas con el número de pacientes disponibles para el estudio y por considerarlos fenotipos más concretos a la hora de caracterizar cada grupo en casos y controles.

En las siguientes tablas se puede observar los resultados del análisis de asociación alélica implementado en este estudio para las clases consideradas (EA globales, pancreatitis, mielosupresión y eficacia al tratamiento con AZA). En ellas se muestran los SNPs seleccionados en cada categoría, ubicación cromosómica, rs-SNP, alelo menor (AM), frecuencias del AM en casos y controles, OR con los IC al 95%, así como la frecuencia alélica mínima en nuestra población estudiada (Gallega) y en la población caucasoide reportada en HapMap, y por último el locus putativo o gen asignado según la base de datos del NCBI Build 35 disponible para mayo de 2004, sobre la cual fue construido el *chip* utilizado en este estudio.

Según el método de corrección para test múltiples que escogimos para evaluar la significación estadística a nivel de estudios de genomas completos, (bonferroni, 10^{-6} , en nuestro caso, 0.05/11.500 test), no obtuvimos ningún SNP que cayera en este rango de significación. Los más significativos en cada grupo llegaron a estar entre o cercanos a una probabilidad de 10^{-5} . Por lo que, mostramos entre los primeros 20 de cada grupo basado en el valor de p más bajo en el test alélico (X^2 o Fisher), y que fueron considerados según nuestra clasificación como *sugestivos de relevancia estadística* cuando presentaron valores de p entre 10^{-5} y 10^{-3} .

Farmacogenómica del AZA
Resultados

Tabla 11. Resultados del análisis de asociación del GWAS para efectos adversos globales. Se muestran los 20 SNPs con valores de p más bajos para el test alélico de X^2 o de Fisher, cromosoma, rs-SNP, alelo menor (AM), frecuencias del AM en casos y controles, valor p, OR con IC 95%, MAF en Gallegos y en CEU (HapMap), y el locus putativo o gen asignado según la base de datos del NCBI Build 35 para mayo de 2004.

| Cr | SNP | AM | Frec Casos | Frec Control | P | OR IC95% | MAF Gal | MAF CEU | Gen |
|----|------------|----|------------|--------------|----------|----------------------|---------|---------|-----------------|
| 17 | rs12453150 | C | 0.33 | 0.56 | 4.40E-05 | 0.39 (0.24-0.61) | 0.46 | 0.45 | FLJ34922 |
| X | rs9943012 | G | 0.22 | 0.04 | 8.47E-05 | 5.84 (2.27-15.01) | 0.12 | ND | LOC139431 |
| 15 | rs2297773 | C | 0.15 | 0.32 | 5.20E-04 | 0.38 (0.22-0.67) | 0.38 | 0.24 | KIAA1024 |
| 5 | rs10941112 | A | 0.58 | 0.39 | 7.95E-04 | 2.11 (1.36-3.29) | 0.47 | 0.60 | AMACR |
| 2 | rs1545133 | C | 0.48 | 0.30 | 8.60E-04 | 2.15 (1.36-3.38) | 0.38 | 0.36 | POLR1B |
| 4 | rs7041 | T | 0.34 | 0.52 | 8.79E-04 | 0.47 (0.30-0.73) | 0.44 | 0.42 | VDB |
| 1 | rs11588069 | C | 0.10 | 0.01 | 9.37E-04 | 6.80 (1.93-23.98) | 0.05 | 0.5 | FABP3 |
| 4 | rs11723381 | C | 0.02 | 0.11 | 9.75E-04 | 0.15 (0.04-0.54) | 0.07 | 0.13 | LOC442123 |
| 5 | rs13157270 | A | 0.16 | 0.05 | 1.19E-03 | 3.56 (1.59-7.97) | 0.10 | 0.09 | MASS1 |
| 12 | rs4272850 | A | 0.30 | 0.15 | 1.29E-03 | 2.37 (1.39-4.04) | 0.22 | 0.26 | TMEM132C |
| 13 | rs17592438 | T | 0.21 | 0.08 | 1.39E-03 | 2.79 (1.46-5.34) | 0.14 | 0.15 | LOC643677 |
| 9 | rs562092 | T | 0.34 | 0.19 | 1.72E-03 | 2.20 (1.33-6.34) | 0.26 | 0.27 | LOC286348 |
| 14 | rs7160694 | A | 0.12 | 0.03 | 1.43E-03 | 4.23 (1.63-10.98) | 0.07 | 0.07 | ENSG00000100629 |
| 19 | rs2288420 | G | 0 | 0.05 | 1.43E-03 | - | 0.03 | 0.03 | PTPRH |
| 1 | rs2297809 | A | 0.06 | 0.18 | 1.53E-03 | 0.31 (0.15-0.66) | 0.13 | 0.14 | CYP4B1 |
| 19 | rs8106117 | G | 0.15 | 0.04 | 1.65E-03 | 3.45 (1.53-7.47) | 0.09 | 0.08 | ZNF626 |
| 1 | rs4646491 | T | 0.06 | 0.18 | 1.74E-03 | 0.31 (0.15-0.67) | 0.13 | 0.14 | CYP4B1 |
| 6 | rs2074468 | A | 0.08 | 0.01 | 1.81E-03 | 8.02 (1.76-36.47) | 0.04 | 0.008 | OR10C1 |
| 18 | rs16942798 | A | 0.08 | 0.01 | 1.81E-03 | 8.02 (1.76-36.47) | 0.04 | 0.03 | LOC440489 |
| 8 | rs17060979 | T | 0.06 | 0.17 | 1.85E-03 | 0.30 (0.14-0.66) | 0.12 | 0.06 | LOC286129 |

En la categoría de EA globales, se pudo obtener dos SNPs con valor de significación de 10^{-5} ; el rs12453150, en el cromosoma 17 y el rs9943012, en el cromosoma X. Seis con probabilidades de 10^{-4} y el resto (12), con valores de 10^{-3} . El rs12453150, pertenece a un gen que codifica para una proteína de unión al ATP de la familia schlafen family member 11. El rs9943012

es un locus putativo del *FTH1P14*. En el segundo y tercer grupo de importancia se observan variaciones considerables de locus o genes involucrados como el caso del rs10941112 que se ubica dentro del gen *AMACR*, o el rs11588069 que involucra al gen *FABP3*.

Tabla 12. Resultados de análisis de asociación GWAS para pancreatitis. Se muestran los 20 SNPs con valores de p más bajos para el test alélico de χ^2 o de Fisher, cromosoma, rs-SNP, alelo menor (AM), frecuencias del AM en casos y controles, valor p, OR con IC 95%, MAF en Gallegos y en CEU (HapMap), y el locus putativo o gen asignado según la base de datos del NCBI Build 35 para mayo de 2004.

| Cr | SNP | AM | Frec Casos | Frec Control | p | OR IC95% | MAF Gal | MAF CEU | Gen |
|----|------------|----|------------|--------------|----------|-----------------------|---------|---------|-----------------|
| 13 | rs10162272 | G | 0.19 | 0.02 | 4.96E-06 | 8.69 (5.98-12.62) | 0.04 | 0.009 | ENSG00000173223 |
| 6 | rs6907580 | A | 0.18 | 0.02 | 1.77E-05 | 7.5 (5.21-10.78) | 0.04 | 0.008 | GPRC6A |
| 3 | rs11919970 | T | 0.28 | 0.07 | 5.95E-05 | 4.71 (3.56-6.24) | 0.10 | 0.10 | EHHADH |
| 14 | rs1713457 | G | 0.15 | 0.02 | 1.14E-04 | 6.93 (4.71-10.2) | 0.04 | 0.03 | TEP1 |
| 15 | rs678892 | T | 0.10 | 0.41 | 1.38E-04 | 0.16 (0.11-0.24) | 0.37 | 0.40 | PIGB |
| 2 | rs2280718 | C | 0.44 | 0.18 | 1.71E-04 | 3.61 (2.83-4.60) | 0.21 | 0.22 | ENSG00000177994 |
| 16 | rs1800124 | G | 0.15 | 0.01 | 4.32E-04 | 10.99 (7.16-16.84) | 0.03 | 0.008 | ERCC4 |
| 1 | rs1338314 | T | 0.15 | 0.03 | 5.14E-04 | 5.58 (3.85-8.09) | 0.04 | 0.09 | SPATA6 |
| 14 | rs9464 | A | 0.21 | 0.05 | 7.93E-04 | 4.29 (3.13-5.84) | 0.07 | 0.09 | ENSG00000022976 |
| 6 | rs2297980 | C | 0.31 | 0.11 | 8.18E-04 | 3.48 (2.67-4.54) | 0.13 | 0.13 | TINAG |
| 14 | rs1053019 | A | 0.21 | 0.06 | 1.04E-03 | 4.17 (3.05-5.72) | 0.07 | 0.09 | ENSG00000022976 |
| 5 | rs162036 | G | 0.27 | 0.09 | 1.20E-03 | 3.65 (2.74-4.85) | 0.11 | 0.23 | MTRR |
| 21 | rs6516605 | G | 0.63 | 0.37 | 1.92E-03 | 2.91 (2.29-3.71) | 0.39 | 0.46 | LOC391269 |
| 7 | rs3735478 | T | 0.02 | 0.23 | 1.23E-03 | 0.08 (0.04-0.17) | 0.21 | 0.31 | ZMIZ2 |
| 16 | rs7499843 | A | 0.55 | 0.29 | 1.54E-03 | 2.91 (2.30-3.69) | 0.32 | 0.32 | WWOX |
| 19 | rs8106117 | G | 0.18 | 0.05 | 2.02E-03 | 4.12 (2.95-5.73) | 0.06 | 0.08 | ENSG00000196721 |
| 4 | rs6841334 | G | 0.63 | 0.36 | 1.84E-03 | 2.92 (2.30-3.72) | 0.39 | 0.38 | KIAA0232 |
| 3 | rs2124489 | T | 0.07 | 0.30 | 1.97E-03 | 0.19 (0.12-0.28) | 0.28 | 0.32 | ENSG00000175856 |
| 3 | rs6767658 | C | 0.5 | 0.26 | 2.19E-03 | 2.82 (2.23-3.57) | 0.28 | 0.30 | LOC285216 |
| 21 | rs6516605 | G | 0.63 | 0.37 | 2.59E-03 | 2.91 (2.29-3.71) | 0.39 | 0.45 | LOC391269 |

Farmacogenómica del AZA

Resultados

En el caso de la pancreatitis, un SNP logro obtener una significación de 10^{-6} , el rs10162272 cuyo gen o posible función es desconocida. Los otros dos SNPs que siguen en orden de importancia estadística (10^{-5}) son el rs6907580 y el rs11919970, en los cromosomas 6 y 3, y que se encuentran en los genes *GPRC6A* y *EHHADH* respectivamente. Del resto, 7 mostraron un valor de p de 10^{-4} y 10 SNPs con valor p de 10^{-3} .

Tabla 13. Resultados de análisis de asociación GWAS para mielosupresión. Se muestran los 20 SNPs con valores de p más bajos para el test alélico de χ^2 o de Fisher, cromosoma, rs-SNP, alelo menor (AM), frecuencias del AM en casos y controles, valor p , OR con IC 95%, MAF en Gallegos y en CEU (HapMap), y el locus putativo o gen asignado según la base de datos del NCBI Build 35 para mayo de 2004.

| Cr | SNP | AM | Frec Casos | Frec Control | P | OR IC95% | MAF Gal | MAF CEU | Gen |
|----|------------|----|------------|--------------|----------|----------------------|---------|---------|-----------------|
| 9 | rs7870554 | T | 0.14 | 0 | 2.50E-04 | - | 0.0188 | 0.008 | KIAA1529 |
| 22 | rs138593 | G | 0.5 | 0.18 | 2.78E-04 | 4.29 (1.87-9.84) | 0.2308 | 0.233 | LOC388910 |
| 4 | rs1042364 | A | 0.57 | 0.24 | 3.25E-04 | 4.18 (1.83-9.51) | 0.2857 | 0.317 | ADH4 |
| 4 | rs2301788 | T | 0.17 | 0.54 | 3.97E-04 | 0.18 (0.06-0.50) | 0.4953 | 0.5 | MAN2B2 |
| 15 | rs11636318 | C | 0.5 | 0.19 | 4.09E-04 | 4.11 (1.80-9.38) | 0.2358 | 0.258 | ENSG00000188869 |
| 12 | rs17183577 | A | 0.57 | 0.24 | 4.36E-04 | 4.05 (1.78-9.23) | 0.2905 | 0.2 | SLC6A15 |
| 19 | rs441827 | T | 0.64 | 0.30 | 4.62E-04 | 4.13 (1.79-9.54) | 0.3495 | 0.35 | NALP4 |
| 22 | rs1065464 | C | 0.30 | 0.07 | 4.91E-04 | 5.14 (1.9-13.92) | 0.1089 | 0.098 | ENSG00000100208 |
| 5 | rs3729961 | G | 0.35 | 0.10 | 5.51E-04 | 4.60 (1.83-11.59) | 0.1452 | 0.117 | IL6ST |
| 4 | rs1126673 | G | 0.61 | 0.27 | 5.69E-04 | 4.18 (1.77-9.88) | 0.3214 | 0.332 | ADH4 |
| 18 | rs17782413 | A | 0.42 | 0.15 | 7.20E-04 | 4.00 (1.71-9.35) | 0.1934 | 0.225 | SERPINB7 |
| 19 | rs12981996 | A | 0.21 | 0.04 | 7.69E-04 | 5.93 (1.88-18.69) | 0.06667 | 0.078 | ENSG00000198024 |
| 4 | rs3749598 | T | 0.28 | 0.07 | 7.84E-04 | 4.80 (1.79-12.85) | 0.1048 | 0.117 | FSTL5 |
| 4 | rs1154400 | C | 0.57 | 0.26 | 8.53E-04 | 3.77 (1.66-8.55) | 0.3019 | 0.35 | ADH5 |
| X | rs2515848 | A | 0.04 | 0.41 | 9.58E-04 | 0.07 (0.009-0.54) | 0.3605 | 0.4 | ENSG00000198930 |
| 4 | rs1126671 | A | 0.57 | 0.26 | 9.92E-04 | 3.72 (1.64-8.43) | 0.3048 | 0.333 | ADH4 |
| X | rs3810651 | T | 0.13 | 0.50 | 1.08E-03 | 0.14 (0.04-0.51) | 0.4516 | 0.442 | GABRQ |
| 4 | rs7681441 | C | 0.14 | 0.005 | 1.14E-03 | 30.5 (3.27-284.3) | 0.02358 | 0 | ENSG00000170105 |
| 4 | rs7681953 | T | 0.14 | 0.005 | 1.14E-03 | 30.5 (3.27-284.3) | 0.02358 | 0 | ENSG00000170105 |
| 4 | rs7682031 | C | 0.14 | 0.005 | 1.14E-03 | 30.5 (3.27-284.3) | 0.02358 | 0 | ENSG00000170105 |

Para la mielosupresión 16 SNPs mostraron valores de p alrededor de 10^{-4} y el resto 10^{-3} . Entre el primer grupo destacan el rs138593 ubicado en el cromosoma 22 y que se ubica en un locus putativo de MicroRNA. Adicionalmente se puede observar un grupo de SNPs relacionados al gen *ADH4*, al igual que otros genes como el *IL6ST* y el *ADH5*.

Tabla 14. Resultados de análisis de asociación GWAS para eficacia. Se muestran los 20 SNPs con valores de p más bajos para el test alélico de X^2 o de Fisher, cromosoma, rs-SNP, alelo menor (AM), frecuencias del AM en casos y controles, valor p, OR con IC 95%, MAF en Gallegos y en CEU (HapMap), y el locus putativo o gen asignado según la base de datos del NCBI Build 35 para mayo de 2004.

| Cr | SNP | AM | Frec Casos | Frec Control | p | OR IC95% | MAF GALLEGOS | MAF CEU | Gen |
|----|------------|----|------------|--------------|----------|----------------------|--------------|---------|---------------------------------------|
| 20 | rs6048760 | A | 0.26 | 0.55 | 3.57E-05 | 0.29 (0.15-0.53) | 0.4969 | 0.57 | <i>ZNF336</i> |
| 20 | rs6063377 | A | 0.21 | 0.47 | 1.03E-04 | 0.29 (0.15-0.55) | 0.4228 | 0.325 | <i>DDX27</i> |
| 7 | rs17151692 | T | 0.20 | 0.05 | 1.12E-04 | 4.56 (1.99-10.44) | 0.0838 | 0.192 | <i>PION</i> |
| 20 | rs3746736 | T | 0.26 | 0.53 | 1.43E-04 | 0.31 (0.17-0.58) | 0.4784 | 0.517 | <i>CSTL1</i> |
| 9 | rs1851724 | C | 0.60 | 0.35 | 1.82E-04 | 2.82 (1.61-4.92) | 0.4043 | 0.508 | <i>OR13C5</i> |
| 1 | rs6427437 | A | 0.22 | 0.48 | 2.03E-04 | 0.31 (0.17-0.59) | 0.4294 | 0.508 | <i>or10t1p</i> |
| 11 | rs11212684 | T | 0.15 | 0.03 | 2.26E-04 | 5.12 (1.98-13.21) | 0.059 | 0.05937 | <i>SLAC2-B</i> |
| 16 | rs12927214 | G | 0.15 | 0.03 | 1.16E-03 | 5.79 (2.06-16.33) | 0.0559 | 0.5 | <i>CNGB1</i> |
| 1 | rs2820289 | T | 0.13 | 0.02 | 1.20E-03 | 5.70 (2.04-15.96) | 0.04908 | 0.058 | <i>NAV1</i> |
| 7 | rs1637214 | A | 0.13 | 0.02 | 2.38E-04 | 5.70 (2.04-15.95) | 0.04908 | 0.026 | <i>ENSG00000136243</i> |
| 15 | rs3812909 | T | 0.53 | 0.29 | 2.69E-04 | 2.73 (1.57-4.74) | 0.3405 | 0.325 | <i>ZNF291</i> |
| 9 | rs10761073 | T | 0.68 | 0.43 | 2.78E-04 | 2.87 (1.60-5.15) | 0.4844 | 0.517 | <i>OR13D1</i> |
| 6 | rs3128917 | G | 0.40 | 0.18 | 3.01E-04 | 2.97 (1.62-5.44) | 0.2313 | 0.308 | <i>MHC class II HLA-SX-alpha gene</i> |
| 14 | rs12435621 | G | 0.28 | 0.11 | 3.06E-04 | 3.22 (1.66-6.21) | 0.1472 | 0.125 | <i>ENSG00000197176</i> |
| 12 | rs1609860 | A | 0.19 | 0.05 | 3.41E-04 | 3.97 (1.78-8.84) | 0.0864 | 0.083 | <i>STAB2</i> |
| 3 | rs6793295 | C | 0.48 | 0.25 | 4.71E-04 | 2.67 (1.52-4.70) | 0.3043 | 0.233 | <i>ENSG00000171757</i> |
| 7 | rs1637215 | C | 0.12 | 0.02 | 5.15E-04 | 5.76 (1.92-17.27) | 0.04487 | 0.034 | <i>NUPL2</i> |
| X | rs6521112 | G | 0.58 | 0.3 | 5.28E-04 | 3.24 (1.63-6.42) | 0.3543 | 0.398 | <i>FLJ20344</i> |
| 6 | rs1043863 | G | 0.04 | 0.21 | 5.85E-04 | 0.16 (0.05-0.56) | 0.184 | 0.169 | <i>SNX9</i> |
| 22 | rs2076671 | T | 0.48 | 0.26 | 6.67E-04 | 2.57 (1.47-4.49) | 0.3117 | 0.3 | <i>APOL5</i> |

Al evaluar la eficacia, se observa que un solo SNP, rs6048760, logró la significación de 10^{-5} . Dicho SNP está ubicado en un gen codificador de una proteína de unión al ADN del tipo dedos de Zinc ubicado en el cromosoma 20. En el resto de los SNPs seleccionados con valores de probabilidad de 10^{-4} , se identifican genes como *SLAC2-B* con el rs11212684, el *CSTL1* con el rs3746736 y *CNGB1* con el rs12927214. Igualmente que a las clases anteriores se observan un grupo de SNPs con función o gen desconocido.

En cuanto al análisis de los genes ya previamente descritos y relacionados con la toxicidad al tratamiento con AZA (*TPMT* e *ITPA*), del total de pacientes reclutados, 232 pudieron ser genotipados para las variantes previamente asociadas con disminución de la actividad de enzimas importantes en el metabolismo del AZA.

En el caso del gen *TPMT* se encontraron 217 individuos con genotipos correspondientes a alelos normales (*1/*1) y 15 con alelos mutados bajo heterocigotos (11 para el alelo *3A, 1 para el alelo *3C y 3 para el alelo *2), no encontrándose individuos homocigotos para alelos mutados. Se observaron las siguientes frecuencias alélicas para el gen *TPMT*; *1=0.9678, *3A=0.024, *3C=0.0021 y *2=0.0064. En el gen *ITPA*, para la variante c.94C>A se encontraron 210 pacientes con genotipos de alelos normales y 22 con alelos mutados en estado de heterocigotos, sin homocigotos mutados. En la variante IVS2+21A>C se consiguieron 158 individuos homocigotos para el alelo normal, 70 pacientes heterocigotos y 4 homocigotos para el alelo mutado. Las frecuencias alélicas fueron de 0.953 para el alelo C en la variante c.94C>A, y de 0.8327 para el alelo A en la variante IVS2+21A>C. Un resumen detallado de los hallazgos genotípicos se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 15. Distribución genotípica en la población total y diferenciada entre casos y controles en los genes *TPMT* e *ITPA* de los pacientes incluidos en el estudio.

| Gen | Genotipo | n (232) | Casos (75) | Controles (94) |
|--------------------|----------|------------|---------------|-------------------|
| TPMT | *1/*1 | 217 | 70 | 90 |
| | *1/*3A | 11 | 4 | 4 |
| | *1/*3C | 1 | 0 | 0 |
| | *1/*2 | 3 | 1 | 0 |
| ITPA c.94 C>A | CC | 210 | 70 | 86 |
| | CA | 22 | 5 | 8 |
| | AA | 0 | 0 | 0 |
| ITPA IVS2+21A>C | AA | 158 | 49 | 65 |
| | AC | 70 | 24 | 27 |
| | CC | 4 | 2 | 2 |

Con relación al *TPMT*, de los 15 individuos heterocigotos, 5 desarrollaron algún tipo de EA, 3 de ellos mielosupresión, 1 pancreatitis y 1 intolerancia digestiva. Para el gen *ITPA* de los

portadores de la variante c.94C>A, 5 pacientes desarrollaron EA, 3 artralgias, 1 reacción cutánea y 1 intolerancia digestiva, mientras que para los portadores de la variante IVS2+21A>C, 24 individuos heterocigotos desarrollaron alguno de EA reportados, al igual que dos homocigotos para el alelo mutado que igualmente desarrollaron intolerancia digestiva y reacción cutánea (Tabla 15).

En la siguiente tabla se puede apreciar el resultado de las pruebas de asociación bajo el test alélico de los genes *TPMT* e *ITPA* y su consideración tanto para los EA globales como para cada uno de forma estratificada.

Tabla 16. Distribución alélica en los genes *TPMT* e *ITPA* para casos y controles para los EA globales y estratificados. Estimaciones estadísticas, valor p según test exacto de Fisher, OR e IC95%.

| TEST A ASOCIACIÓN ALELICA | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|----------|-------------|-----------|---------------|------|------------|
| Variantes | Clase estudiada | wt Control | wt Casos | mut Control | mut Casos | p | OR | IC95% |
| <i>TPMT</i> | | | | | | | | |
| | EA globales | 180 | 141 | 4 | 5 | 0.5161 | 1.60 | 0.42-6.05 |
| | Mol. Digst | 299 | 31 | 9 | 1 | 1 | 1.07 | 0.13-8.74 |
| | Pancreatitis | 299 | 35 | 9 | 1 | 1 | 0.95 | 0.12-7.72 |
| | Mielosupresión | 180 | 25 | 4 | 3 | <u>0.0481</u> | 5.40 | 1.14-25.55 |
| | Alopecia | 299 | 2 | 9 | 0 | 1 | - | - |
| | Artralgias | 299 | 12 | 9 | 0 | 1 | - | - |
| | Hepatitis | 299 | 10 | 9 | 0 | 1 | - | - |
| | RX cutánea | 299 | 26 | 9 | 0 | 1 | - | - |
| <i>ITPA</i> | | | | | | | | |
| rs3177087 | EA globales | 176 | 141 | 8 | 5 | 0.7801 | 0.78 | 0.25-2.44 |
| | Mol. Digst | 291 | 31 | 17 | 1 | 1 | 0.55 | 0.07-4.29 |
| | Pancreatitis | 291 | 36 | 17 | 0 | 0.2347 | - | - |
| | Mielosupresión | 176 | 28 | 8 | 0 | 0.6008 | - | - |
| | Alopecia | 291 | 2 | 17 | 0 | 1 | - | - |
| | Artralgias | 291 | 9 | 17 | 3 | <u>0.0321</u> | 5.71 | 1.41-23.03 |
| | Hepatitis | 291 | 10 | 17 | 0 | 1 | - | - |
| | RX cutánea | 291 | 25 | 17 | 1 | 1 | 0.68 | 0.09-5.36 |
| rs7270101 | EA globales | 154 | 118 | 30 | 28 | 0.5608 | 1.22 | 0.69-2.15 |
| | Mol. Digst | 260 | 24 | 48 | 8 | 0.2072 | 1.81 | 0.77-4.26 |
| | Pancreatitis | 260 | 28 | 48 | 8 | 0.3387 | 1.55 | 0.67-3.60 |
| | Mielosupresión | 154 | 24 | 30 | 4 | 1 | 0.86 | 0.28-2.64 |
| | Alopecia | 260 | 1 | 48 | 1 | 0.2916 | 5.42 | 0.33-88.09 |
| | Artralgias | 260 | 10 | 48 | 2 | 1 | 1.08 | 0.23-5.10 |
| | Hepatitis | 260 | 9 | 48 | 1 | 1 | 0.60 | 0.07-4.86 |
| | RX cutánea | 260 | 22 | 48 | 4 | 1 | 0.98 | 0.32-2.99 |

*Rx: reacción

Al realizar las comparaciones estadísticas se puede notar que no existen diferencias estadísticamente significativas para los EA globales para ninguno de los dos genes o variantes génicas implicadas en cada análisis. Mientras que para el caso del *TPMT* y la mielosupresión

Farmacogenómica del AZA

Resultados

existe una asociación significativa con un valor de p de 0.0481 (OR 5.40, IC95% 1.14-25.55) en el test alélico y para la prueba genotípica con una p de 0.0334 (OR de 7.5, IC95% 1.4456-38.91) (datos no mostrados). Al igual que para el gen *ITPA*, donde la variante c.94C>A se asoció de forma positiva con el desarrollo de artralgias con un valor de p en el test alélico de 0.0321 (OR 5.71, IC95% 1.41-23.03) y en el test genotípico una p de 0.0251 (OR 8.235 IC95% 1.75-44.08) (datos no mostrados). Para el resto de los EA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias entre los controles y los casos bajo ningún tipo de test ni el alélico ni el genotípico ($p > 0.05$).

Por otro lado, al evaluar la relación de estos polimorfismos y la eficacia al tratamiento con AZA se observó que de los portadores de variantes en el gen *TPMT*, cuatro pacientes detuvieron el tratamiento por no obtener respuesta favorable y 8 de ellos toleraron bien el AZA, no pudiéndose determinar el estatus en 3 de los pacientes. Mientras que para el gen *ITPA*, con la variante c.94C>A, 8 pacientes detuvieron el tratamiento por no respuesta, 10 lo toleraron bien y en 4 no pudo ser determinada. Mientras que para los portadores de la IVS2+21A>C, en 24 no pudo ser determinada, 10 no respondieron y en 40 la respuesta fue favorable.

Tabla 17. Relación entre las variantes en *TPMT* e *ITPA* con la respuesta en pacientes tratados con AZA.

| Gen | Genotipo | Respondedores (133) | No respondedores (34) | Indeterminado (65) |
|-------------|-------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| <i>TPMT</i> | wt/wt | 125 | 30 | 62 |
| | wt/mut | 8 | 4 | 3 |
| OR | | | 2.7455 | |
| (IC95%) | | | 0.8172 -9.2234 | |
| Valor-p | | | 0.096 | |
| <i>ITPA</i> | wt/wt | 123 | 26 | 61 |
| | c.94 C>A wt/mut | 10 | 8 | 4 |
| OR | | | 4.3214 | |
| (IC95%) | | | 1.572-11.8797 | |
| Valor-p | | | 0.005 | |
| <i>ITPA</i> | wt/wt | 93 | 24 | 41 |
| | IVS2+21A>C wt/mut | 40 | 10 | 24 |
| OR | | | 0.8333 | |
| (IC95%) | | | 0.3686-1.8837 | |
| Valor-p | | | 0.7363 | |

Al hacer la valoración estadística se pudo determinar que existe una asociación significativa entre la presencia de la variante c.94C>A en el gen *ITPA* y la respuesta al tratamiento

con AZA, con un OR de 4.3214 (IC95%: 1.572-11.8797) y un valor de p de 0.005 al test genotípico como se puede observar en la tabla 17.

Sin embargo, esta asociación entre *ITPA* y eficacia no se ha logrado confirma en el estudio de la réplica.

B. Estudio de la replica

1. Datos de la población.

En el caso de estudios de genoma completo, en especial cuando se desarrollan con pequeños grupos de muestras, las cuales pueden llegar a ser insuficientes para detectar loci con un efecto bajo o moderado, se hace necesaria la validación de los hallazgos principales en un segundo grupo de pacientes con similares características que permitan corroborar o no los resultados encontrados en el primer experimento, emergiendo éstos, de ser ciertos, como asociaciones reales reproducibles.

Adicionalmente a este objetivo principal de hacer la validación en un grupo de réplica, en este segundo paso, se recomienda que el mismo sea realizado como ya se mencionó anteriormente en un grupo de pacientes diferentes al inicial, por un lado, y asimismo, utilizar una plataforma de genotipado diferente, con el objetivo de poder realizar una evaluación sistemática del proceso que permita determinar posibles fuentes de error o sesgo que podrían haber sido responsables de un falso hallazgo inicial.

En nuestro caso el grupo de réplica estuvo constituido por pacientes con EII que recibieron AZA como tratamiento y que pertenecen al Estudio Nacional en Enfermedad Inflamatoria Intestinal sobre Determinantes Genéticos y Ambientales (ENEIDA). Los pacientes procedían de distintos hospitales de las comunidades de Cataluña y Madrid. Detalles demográficos son presentados en la tabla 18. De los 264 pacientes remitidos, luego de la clasificación y selección de los casos y controles en base a los criterios de tiempo de exposición al fármaco y tipo de EA, se escogieron para la posterior evaluación con relación a los EA globales a 85 casos y 63 controles, para la pancreatitis 19 casos y 93 controles, en mielosupresión cumplieron con los criterios como casos 29 y controles 58, mientras que para la eficacia quedaron 30 casos y 60 controles.

Tabla 18. Datos demográficos de los pacientes incluidos como grupo de réplica.

| Categoría | n (264) | % |
|---|-------------------|-------|
| Diagnóstico | | |
| Enfermedad de Crohn | 174 | 66.29 |
| Colitis Ulcerosa | 90 | 33.71 |
| Sexo | | |
| Masculino | 134 | 50.76 |
| Femenino | 130 | 49.24 |
| Edad | | |
| Promedio (Años) | 34 (9-78) | 100 |
| Fumador | | |
| Sí | 71 | 26.89 |
| No | 182 | 68.94 |
| ND* | 11 | 4.17 |
| Dosis media de AZA (mg/kg/día[rango]) | 2.68 [1,0-3,5] | - |
| Tiempo de tratamiento (meses[rango]) | 41 (1-199) | - |
| Respuesta a AZA | | |
| No respondedores | 30 | 33.33 |
| Respondedores | 60 | 66.66 |
| Indeterminados | 174 | - |
| Efectos Adversos | | |
| No | 175 | 67.80 |
| Sí | 85 | 32.19 |
| Tipo de Efecto Adverso | | |
| Pancreatitis | 19 | 7.20 |
| Intolerancia Digestiva | 27 | 10.62 |
| Mielosupresión | 29 | 10.98 |
| Hepatotoxicidad | 12 | 6.06 |
| Artralgias | 4 | 1.51 |
| Alopecia | 3 | 1.51 |
| Otros: combinados | 9 | - |

*ND: No determinado

2. Datos del genotipado.

Con relación a los SNPs, para la réplica fueron seleccionados un total de 106 SNPs distribuidos en 4 reacciones múltiples analizados por la tecnología de Sequenom MassArray. Estos fueron seleccionados, como se comentó en el apartado de materiales y métodos, en función de los que presentaron un valor de p más bajo para las pruebas alélicas ya sea con la prueba de Fisher o el X^2 en cada categoría de análisis (EA globales, pancreatitis, mielosupresión y

eficacia), además se incorporaron algunos SNPs que resultaron interesantes bajo el modelo dominante y otros tras un análisis de regresión logística ajustado por las covariables mencionadas.

Luego del genotipado del grupo de réplica se siguió con el control de calidad de cada SNP y muestra. Se lograron genotipar con éxito un total de 94 SNPs, de los cuales dos fueron eliminados, uno por ser monomórfico y otro por no cumplir el Equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles. Se eliminaron 3 individuos por incongruencias en relación al sexo fenotípico y molecular y 13 fueron eliminados por tener una tasa de genotipado < al 80%. Con relación a las muestras, la distribución de casos y controles quedó definida para EA globales con 80 casos y 59 controles, para pancreatitis con 17 casos y 88 controles, mielosupresión con 25 casos y 53 controles y para la eficacia 29 casos y 55 controles.

3. Pruebas de asociación en la réplica.

Se determinó la asociación estadística utilizando la diferencia de frecuencias alélicas entre casos y controles usando el X^2 o la prueba exacta de Fisher en los casos donde había un valor menor a 5 en algunas de las celdas de las tablas de contingencia, al igual que en análisis de la población inicial. Adicionalmente se estimó la probabilidad conjunta, en una meta-análisis que agrupaba la información de las dos cohortes de pacientes, la inicial y la de la réplica utilizando el estadístico CMH (Cochran-Mantel-Haenszel), que calcula una probabilidad y un OR combinada con los dos niveles considerados.

En las siguientes tablas (tablas de la 19 a la 22), se puede observar un resumen de los datos generados y los resultados obtenidos en la réplica así como el estudio en conjunto. Se muestran los datos replicados con mayores significación en el test alélico.

En términos generales los resultados de la réplica en cada una de las clases estudiadas no reflejan valores estadísticamente significativos pues no entran en el nivel de significación estipulado al hacer corrección por test múltiples (5×10^{-4} , bonferroni para 92 test), y además con una tendencia a ser más discretos que en el estudio inicial, lo cual es de considerar debido al número de muestras analizadas. Sin embargo, al evaluar la probabilidad conjunta (CMH) puede apreciarse algunos SNPs que logran obtener un valor significativo ($p < 0.0005$), y con OR en la misma tendencia al estudio inicial. No obstante, en muchos casos esta significación en el CMH se debe al impulso dado por el valor de p en la población inicial.

Tabla 19. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto para el desarrollo de efectos adversos globales.

| Cr | SNP | Análisis | P | OR | IC95% | Gen |
|----|------------|----------|-----------|--------|------------|-----------------|
| 17 | rs12453150 | INICIAL | 4.40E-05 | 0.3922 | 0.24-0.61 | FLJ34922 |
| | | REPLICA | 8.064E-01 | 1.06 | 0.66-1.72 | |
| | | CONJUNTO | 1.49E-03 | 1.69 | 1.22-2.34 | |
| 12 | rs4272850 | INICIAL | 1.29E-03 | 2.372 | 1.39-4.04 | TMEM132C |
| | | REPLICA | 2.587E-01 | 1.41 | 0.78-2.56 | |
| | | CONJUNTO | 1.67E-03 | 1.88 | 1.26-2.79 | |
| 13 | rs17592438 | INICIAL | 1.39E-03 | 2.797 | 1.46-5.34 | LOC643677 |
| | | REPLICA | 2.697E-01 | 1.46 | 0.74-2.87 | |
| | | CONJUNTO | 2.12E-03 | 2.05 | 1.28-3.27 | |
| 23 | rs9943012 | INICIAL | 4.38E-06 | 5.848 | 2.27-15.01 | LOC139431 |
| | | REPLICA | 7.780E-01 | 0.91 | 0.46-1.78 | |
| | | CONJUNTO | 2.17E-03 | 2.07 | 1.27-3.36 | |
| 2 | rs1545133 | INICIAL | 8.60E-04 | 2.152 | 1.36-3.38 | POLR1B |
| | | REPLICA | 3.969E-01 | 1.24 | 0.75-2.05 | |
| | | CONJUNTO | 2.37E-03 | 1.68 | 1.20-2.35 | |
| 5 | rs13157270 | INICIAL | 1.20E-03 | 3.56 | 1.59-7.97 | MASS1 |
| | | REPLICA | 6.350E-01 | 1.26 | 0.48-3.31 | |
| | | CONJUNTO | 4.45E-03 | 2.35 | 1.28-4.33 | |
| 12 | rs2300455 | INICIAL | 5.27E-04 | 3.7 | 1.95-8.97 | ACACB |
| | | REPLICA | 3.88E-01 | 1.39 | 0.69-2.81 | |
| | | CONJUNTO | 6.10E-03 | 1.86 | 1.19-2.92 | |
| 14 | rs7160694 | INICIAL | 1.43E-03 | 4.238 | 1.63-10.98 | ENSG00000100629 |
| | | REPLICA | 7.895E-01 | 1.17 | 0.37-3.67 | |
| | | CONJUNTO | 6.62E-03 | 2.57 | 1.25-5.25 | |
| 5 | rs10941112 | INICIAL | 7.95E-04 | 2.119 | 1.36-3.29 | AMACR |
| | | REPLICA | 8.281E-01 | 1.05 | 0.65-1.71 | |
| | | CONJUNTO | 8.44E-03 | 1.54 | 1.12-2.13 | |

En el caso de los EA globales ninguno de los SNPs seleccionados muestra una señal significativa que pueda ser considerado como de importancia en esta clase de análisis. La *p* en la réplica no llega a ser menor a 0.05 en ningún caso.

Tabla 20. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando pancreatitis.

| Cr | SNP | Análisis | P | OR | IC95% | Gen |
|----|------------|----------|----------|--------|------------|-----------------|
| 16 | rs1800124 | INICIAL | 4.32E-04 | 10.99 | 7.16-16.84 | <i>ERCC4</i> |
| | | REPLICA | 3.21E-01 | 2.11 | 0.39-11.37 | |
| | | CONJUNTO | 7.24E-05 | 5.51 | 2.12-14.30 | |
| 13 | rs10162272 | INICIAL | 4.96E-06 | 8.69 | 5.98-12.62 | ENSG00000173223 |
| | | REPLICA | 2.71E-01 | 1.95 | 0.58-6.54 | |
| | | CONJUNTO | 1.51E-04 | 4.00 | 1.83-8.75 | |
| 3 | rs11919970 | INICIAL | 5.95E-05 | 4.719 | 3.56-6.24 | <i>EHHADH</i> |
| | | REPLICA | 3.41E-01 | 1.78 | 0.54-5.88 | |
| | | CONJUNTO | 2.03E-04 | 3.31 | 1.70-6.44 | |
| 2 | rs2280718 | INICIAL | 1.71E-04 | 3.614 | 2.83-4.60 | ENSG00000177994 |
| | | REPLICA | 4.44E-01 | 1.38 | 0.61-3.12 | |
| | | CONJUNTO | 1.22E-03 | 2.32 | 1.37-3.93 | |
| 6 | rs6907580 | INICIAL | 1.77E-05 | 7.502 | 5.21-10.78 | <i>GPRC6A</i> |
| | | REPLICA | 8.90E-01 | 1.12 | 0.23-5.42 | |
| | | CONJUNTO | 1.63E-03 | 3.44 | 1.50-7.89 | |
| 6 | rs2297980 | INICIAL | 8.18E-04 | 3.487 | 2.67-4.54 | <i>TINAG</i> |
| | | REPLICA | 4.67E-01 | 1.55 | 0.47-5.08 | |
| | | CONJUNTO | 1.82E-03 | 2.67 | 1.41-5.05 | |
| 14 | rs9464 | INICIAL | 7.93E-04 | 4.296 | 3.13-5.88 | ENSG00000022976 |
| | | REPLICA | 7.49E-01 | 1.30 | 0.26-6.39 | |
| | | CONJUNTO | 4.00E-03 | 2.97 | 1.37-6.47 | |
| 15 | rs678892 | INICIAL | 1.37E-04 | 0.1685 | 0.11-0.24 | <i>PIGB</i> |
| | | REPLICA | 9.19E-01 | 0.96 | 0.45-2.07 | |
| | | CONJUNTO | 5.48E-03 | 0.45 | 0.25-0.80 | |
| 14 | rs1053019 | INICIAL | 1.04E-03 | 4.178 | 3.05-5.72 | ENSG00000022976 |
| | | REPLICA | 8.08E-01 | 1.22 | 0.25-6.01 | |
| | | CONJUNTO | 5.70E-03 | 2.85 | 1.31-6.21 | |

Igualmente en el caso de la pancreatitis no se observa ningún SNP con valores significativos a nivel de la réplica (<0.05).

Tabla 21. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando mielosupresión.

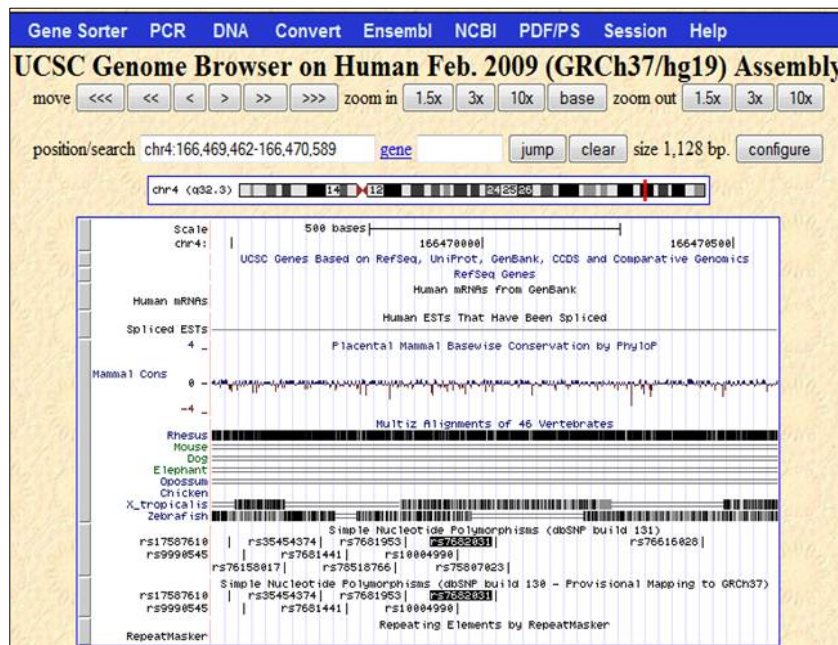
| Cr | SNP | Análisis | P | OR | IC95% | Gen |
|----|------------|----------|----------|-------|------------|-----------------|
| 4 | rs7681441 | INICIAL | 1.14E-03 | 30.5 | 3.27-284.3 | ENSG00000170105 |
| | | REPLICA | 2.46E-01 | 4.29 | 0.38-48.49 | |
| | | CONJUNTO | 7.30E-05 | 11.27 | 2.24-56.70 | |
| 4 | rs7681953 | INICIAL | 1.14E-03 | 30.5 | 3.27-284.3 | ENSG00000170105 |
| | | REPLICA | 2.46E-01 | 4.29 | 0.38-48.49 | |
| | | CONJUNTO | 7.30E-05 | 11.27 | 2.24-56.70 | |
| 4 | rs7682031 | INICIAL | 1.14E-03 | 30.5 | 3.27-284.3 | ENSG00000170105 |
| | | REPLICA | 2.46E-01 | 4.29 | 0.38-48.49 | |
| | | CONJUNTO | 7.30E-05 | 11.27 | 2.24-56.70 | |
| 5 | rs3729961 | INICIAL | 5.50E-04 | 4.608 | 1.83-11.59 | IL6ST |
| | | REPLICA | 3.55E-02 | 2.98 | 1.04-8.54 | |
| | | CONJUNTO | 9.59E-05 | 3.74 | 1.86-7.52 | |
| 2 | rs2438101 | INICIAL | 1.14E-03 | 30.5 | 3.27-284.3 | ENSG00000188464 |
| | | REPLICA | 5.51E-01 | 2.06 | 0.13-33.65 | |
| | | CONJUNTO | 2.33E-04 | 9.45 | 1.88-47.60 | |
| 9 | rs7870554 | INICIAL | 2.50E-04 | 0 | 0 | KIAA1529 |
| | | REPLICA | 5.98E-01 | 2.08 | 0.28-15.24 | |
| | | CONJUNTO | 2.94E-04 | 7.58 | 1.76-32.58 | |
| 4 | rs3749598* | INICIAL | 7.84E-04 | 4.8 | 1.79-12.85 | FSTL5 |
| | | REPLICA | 1.05E-01 | 2.70 | 0.78-9.32 | |
| | | CONJUNTO | 4.36E-04 | 3.71 | 1.70-8.11 | |
| 22 | rs138593 | INICIAL | 2.78E-04 | 4.294 | 1.87-9.843 | LOC388910 |
| | | REPLICA | 2.68E-01 | 1.57 | 0.70-3.51 | |
| | | CONJUNTO | 1.27E-03 | 2.48 | 1.40-4.40 | |
| 19 | rs441827 | INICIAL | 4.62E-04 | 4.133 | 1.79-9.541 | NALP4 |
| | | REPLICA | 2.74E-01 | 1.51 | 0.72-3.14 | |
| | | CONJUNTO | 1.66E-03 | 2.34 | 1.36-4.02 | |
| 15 | rs11636318 | INICIAL | 4.09E-04 | 4.111 | 1.80-9.386 | ENSG00000188869 |
| | | REPLICA | 4.50E-01 | 1.35 | 0.62-2.94 | |
| | | CONJUNTO | 4.32E-03 | 2.20 | 1.26-3.85 | |

*considerado tras el análisis del modelo dominante

En el análisis de la mielosupresión, se observa como dato resaltante el rs3729961 en el gen de la *IL6ST*, que presenta una probabilidad bruta en la réplica <0.05 ($p=0.0355$), y una probabilidad conjunta (CMH) de 9.59×10^{-5} , un OR de 3.74 (IC95% 1.86-752), y con una MAF en gallegos de 14.52%, y entre casos y controles de 35% vs 10%, respectivamente (tabla 13). Adicionalmente destaca bajo el análisis con el modelo dominante en el caso de la mielosupresión el rs3749598 que está ubicado en el gen *FSTL5*. Llega a presentar una p conjunta en CHM de 6×10^{-5} , con una $p < 0.001$ en el estudio inicial y con $p < 0.05$ en la réplica.

Por otro lado, aunque sin relevancia estadística en el grupo de la réplica cabe mencionar igualmente la probabilidad conjunta significativa de un grupo de marcadores ubicados en el cromosoma 4; el rs7681441, el rs7681953 y el rs7682031, entre las posiciones cromosómicas 166827334-166827631. Sin embargo, al realizar la evaluación de esta zona cromosómica se puede apreciar que hasta el momento no presenta algún gen reconocido o asignado en el catálogo del Genoma Humano para febrero del 2009 (GRCh37/hg19), como se aprecia en la siguiente figura:

Figura 31. Detalle de la región cromosómica 4q32.3 según el UCSC Genome Browser de la Univ. De California, USA. Se representa gráfica con detalle de genes descritos, conservación entre especies y SNPs en la zona.



En relación a la evaluación de la eficacia dos SNPs presentan probabilidades conjuntas en el rango significativo así como unos valores p en la réplica inferior o alrededor de 0.05 ($p \leq 0.10$), por lo cual lo consideramos sugestivo e importante de mencionar. El rs17151692 en el cromosoma 7 ($p=0.02$) y el rs6521112 en el cromosoma X ($p=0.08$). El primero ubicado en el gen *PION* y el segundo asociado a un gen codificante de una proteína del tipo dedos de Zinc, un factor de transcripción (*ZNF673*). Estos marcadores mostraron una p conjunta de 4.26×10^{-6} y 1.80×10^{-4} , respectivamente, con unos OR en la misma dirección de lo presentado tanto en el estudio original como en la réplica. Igualmente se suma en significación al considerar el análisis con covariables el rs6460195 ubicado en el gen *ZNF138* en el cromosoma 7 con un valor de p inicial

Farmacogenómica del AZA

Resultados

de 2.37×10^{-3} , en la réplica con un valor < 0.05 y una p conjunta de 5.10×10^{-5} , en todos los casos se mantienen los OR con la misma tendencia.

Tabla 22. Resultados del análisis de la réplica y meta-análisis de resultados en conjunto evaluando la eficacia.

| Cr | SNP | Análisis | P | OR | IC95% | Gen |
|----|------------|----------|----------|--------|------------|-----------------|
| 7 | rs17151692 | INICIAL | 1.12E-04 | 4.569 | 1.99-10.44 | PION |
| | | REPLICA | 1.09E-02 | 4.52 | 1.30-15.77 | |
| | | CONJUNTO | 4.26E-06 | 4.55 | 2.28-9.10 | |
| X | rs6521112 | INICIAL | 5.28E-04 | 3.241 | 1.63-6.42 | FLJ20344/ZNF673 |
| | | REPLICA | 8.63E-02 | 1.93 | 0.91-4.10 | |
| | | CONJUNTO | 1.80E-04 | 2.58 | 1.56-4.27 | |
| 7 | rs6460195* | INICIAL | 2.37E-03 | 2.621 | 1.42-4.82 | ZNF138 |
| | | REPLICA | 1.24E-02 | 2.48 | 1.23-5.02 | |
| | | CONJUNTO | 5.10E-05 | 2.56 | 1.61-4.06 | |
| 20 | rs6063377 | INICIAL | 1.03E-04 | 0.2955 | 0.15-0.55 | DDX27 |
| | | REPLICA | 7.69E-01 | 0.91 | 0.47-1.75 | |
| | | CONJUNTO | 1.55E-03 | 0.49 | 0.31-0.77 | |
| 15 | rs3812909 | INICIAL | 2.69E-04 | 2.733 | 1.57-4.74 | ZNF291 |
| | | REPLICA | 7.24E-01 | 1.13 | 0.57-2.25 | |
| | | CONJUNTO | 2.43E-03 | 1.91 | 1.25-2.93 | |
| 3 | rs6793295 | INICIAL | 4.71E-04 | 2.678 | 1.52-4.70 | ENSG00000171757 |
| | | REPLICA | 7.40E-01 | 1.14 | 0.53-2.44 | |
| | | CONJUNTO | 3.06E-03 | 1.95 | 1.24-3.05 | |
| 6 | rs1043863 | INICIAL | 5.85E-04 | 0.1696 | 0.05-0.56 | SNX9 |
| | | REPLICA | 8.05E-01 | 0.78 | 0.28-2.13 | |
| | | CONJUNTO | 3.42E-03 | 0.34 | 0.16-0.72 | |
| 20 | rs3746736 | INICIAL | 1.42E-04 | 0.3198 | 0.17-0.58 | CSTL1 |
| | | REPLICA | 8.91E-01 | 1.05 | 0.55-2.00 | |
| | | CONJUNTO | 4.87E-03 | 0.54 | 0.35-0.84 | |
| 9 | rs10761073 | INICIAL | 2.78E-04 | 2.874 | 1.60-5.15 | OR13D1 |
| | | REPLICA | 9.90E-01 | 1.00 | 0.52-1.90 | |
| | | CONJUNTO | 5.75E-03 | 1.80 | 1.18-2.76 | |
| 9 | rs1851724 | INICIAL | 1.82E-04 | 2.823 | 1.61-4.92 | OR13C5 |
| | | REPLICA | 6.90E-01 | 0.87 | 0.44-1.72 | |
| | | CONJUNTO | 8.06E-03 | 1.75 | 1.15-2.67 | |
| 12 | rs1609860 | INICIAL | 3.41E-04 | 3.974 | 1.78-8.84 | STAB2 |
| | | REPLICA | 7.61E-01 | 0.83 | 0.24-2.82 | |
| | | CONJUNTO | 9.55E-03 | 2.27 | 1.18-4.37 | |

*incluido en la réplica tras el análisis logístico ajustado por covariables

V. Discusión

1. Consideraciones generales.

En el estudio de asociación de genoma completo en relación al desarrollo de EA globales al tratamiento con AZA, así como para la aparición de pancreatitis o mielosupresión y al igual que la evaluación de la eficacia, no hemos encontrado ningún SNP que cumpla con el criterio de significación estadística establecido en nuestro análisis (bonferroni, 10^{-6}). En este sentido, posterior a la realización de un estudio de asociación y a la evaluación de los resultados si se consigue que no existe diferencias estadísticas entre las variables estudiadas se debe considerar si la ausencia de significación indica realmente que no existe una diferencia o asociación clínicamente relevante, o simplemente que no se dispone de suficiente número de pacientes para obtener hallazgos significativos. En nuestro caso, reconocemos que en nuestro estudio, con 233 pacientes totales, que además se ve fraccionado en cada una de las clases consideradas el valor de pacientes integrantes de cada grupo se hace mucho menor aunado a los aproximadamente 11.200 SNPs que entraron en el análisis presenta una limitación considerable en relación al efecto del locus que esperaríamos haber encontrado o incluso aquellos que esperaríamos haber dejado fuera.

Si bien la baja potencia es una característica común a los estudios de farmacogenética, la muestra analizada (por ej. en el caso de la mielosupresión) muestra un 80% de poder (potencia) para detectar al nivel de significación de GWAS la asociación de un SNP de frecuencia moderada con un OR de 9.5. Esto supone que genes (SNPs) de efecto considerablemente mayor a esto deberían haber sido detectados en nuestro estudio y sin embargo no ha sido así, apoyando la idea de la ausencia de genes de efecto mayor en EII.

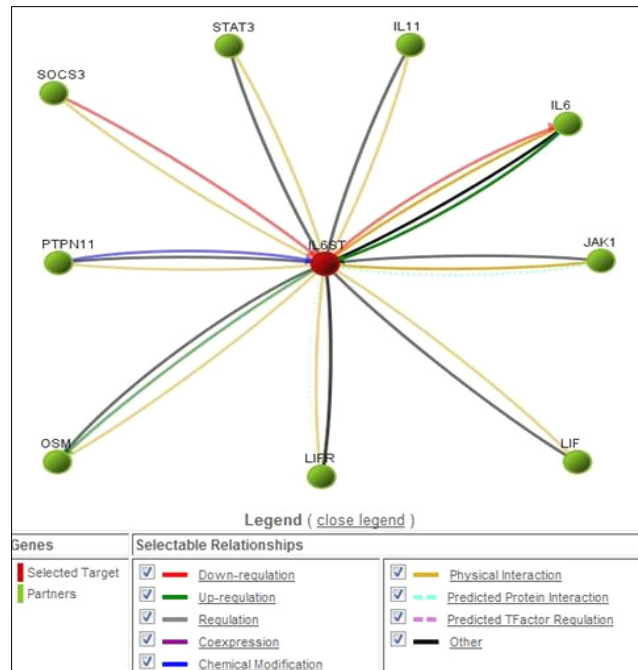
Sin embargo, hemos conseguido evidencia sugerente de asociación con SNPs posiblemente implicados en algunos genes nuevos tanto para la mielosupresión como para la eficacia al tratamiento con AZA.

2. Genes implicados en la mielosupresión.

2.1 El gen *IL6ST*

Tal es el caso del rs3729961 ubicado en la región 5'UTR del gen *IL6ST*, el cual ha sido mapeado en el cromosoma 5q11.2 (140), contiene 14 exones y llega a expandir aproximadamente una región de 51 kb. La proteína codificada por este gen, también conocida como gp130, es un transductor de señal compartida por muchas citosinas (141), como la interleucina6 (IL-6), la interleucina 11 (IL-11), el factor inhibitorio de la leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), y la oncostatin M (OSM) (142), entre otros.

Figura 32. Diagrama de interacción génica entre el gen *IL6ST* y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular.



La IL-6 es una citoquina inmunomoduladora que actúa a nivel de la superficie celular como parte de un complejo de ensamble proteico que interviene en la activación de la señalización intracelular compuesta de IL6, IL6RA, y del receptor gp130 (*IL6ST*) (143). La IL-11 es una citosina multifuncional aislada por primera vez en 1990. Es un regulador clave de múltiples eventos en la hematopoyesis, en particular de la estimulación de la maduración de megacariocitos (144). El factor inhibitorio de la leucemia (*LIF*), es igualmente una citoquina de clase 6, reguladora del crecimiento y desarrollo celular. Participa como molécula intermediaria entre el sistema inmune y diversos procesos fisiológicos, interviniendo en la promoción del crecimiento y diferenciación de diferentes tipos celulares así como el desarrollo neuronal y la implantación del cigoto (145,146). El factor neurotrófico ciliar (*CNTF*), es una proteína con funciones regulatorias del crecimiento del sistema nervioso, tanto como estimulante del mismo como de protector de su degradación ante la presencia de procesos inflamatorios (147), y la OSM es una citocina pleiotrópica que pertenece al grupo de la IL-6, muy parecida a LIF en estructura y función. Se estima que trabaja a nivel del desarrollo del hígado, hematopoyesis, la inflamación y

posiblemente el desarrollo del SNC. También se asocia con la formación y recambio o destrucción ósea (148,149).

Todas estas citoquinas actúan a través del complejo receptor de membrana del que forma parte la proteína gp130, donde la señalización se desencadena por homodimerización de IL-6 o por la heterodimerización de las proteínas LIF-Rb/gp190, IL11, LIF, OSM y CNTF, junto a la gp130 (150,151). Razón por la cual, estas citosinas intervienen en actividades similares en diversos tejidos biológicos.

Estudios en modelos animales (ratones), sugieren que el gen *IL6ST* juega un papel crítico en la regulación de la apoptosis de los miocitos, participando en la respuesta de las células cardíacas ante el stress fisiológico (152). También se han podido asociar ciertos defectos a nivel del sistema de señalización intracelular de vías reguladas por STAT1/3 y SHP2-Ras-ERK, que tienen en común a la proteína gp130, con fenotipos relacionados con afectación a nivel de la mucosa gastrointestinal (153).

Igualmente, se reportan alteraciones a nivel de la proteína gp130 relacionadas con el desarrollo de patologías autoinmunes como la artritis reumatoide (154). Otras evidencias mostradas por Nakagawa y cols., en el 2010, relacionan la acción de la IL-6, con el desarrollo de enfermedades crónicas autoinmunes. La IL-6 regula positivamente el desarrollo de linfocitos T-CD8 vía Foxp3 las cuales a su vez regulan la inflamación crónica en la artritis reumatoide con la participación de células T(h)17(155).

Igualmente mutaciones en el gen *IL6ST*, son encontrados casi exclusivamente y forman parte de la clasificación molecular del carcinoma hepatocelular, un tumor frecuente derivado de la transformación maligna de los hepatocitos (156), donde este gen funciona como un oncogén.

Aunque hasta el momento no se ha demostrado una asociación directa entre el *IL6ST* y su activación ante la acción de algún fármaco o una posible vinculación directa con la mielosupresión, el papel que se ha venido describiendo sobre su participación directa o por las proteínas que lo acompañan, en procesos inmunológicos crónicos y cancerosos, así como la regulación de los procesos fisiológicos de crecimiento, maduración y diferenciación de diferentes tipos celulares, entre ellas las hematopoyéticas, lo hace un buen candidato para seguimiento en estudios posteriores que permitan dilucidar y establecer su relación con el desarrollo de la mielosupresión en pacientes con una enfermedad de compromiso inmunológico, como lo es la EI y su respuesta ante la aplicación del tratamiento con AZA.

En el mismo sentido, al considerar las probables variaciones patológicas en algunas de las otras proteínas que intervienen en el complejo integradas a gp130, es importante destacar el papel que pueda estar desarrollando la IL-11 con el fenotipo de mielosupresión aquí relacionado.

La IL-11, inicialmente descrita en 1990 (157), es definida principalmente como una citocina hematopoyética. El gen se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 19, específicamente en 19q13.3-q13.4. Es miembro de la familia de la IL-6 ya que utiliza a la proteína gp130 como el componente de señalización de su receptor.

Desde el año 1993, es reconocido su importante papel en procesos hematopoyéticos y del sistema linfóide. La proteína purificada muestra una actividad multifuncional, que influyen en la proliferación y diferenciación linfohematopoyética de células madre, proliferación y diferenciación de células progenitoras megacariocíticas, proliferación de células progenitoras eritroides, la maduración de linfocitos B, la activación de los hepatocitos, síntesis de proteínas de fase aguda y la adipogénesis (158). Estudios en primates han demostrado que la aplicación de IL-11 recombinante es efectiva para reducir y aminorar la severidad de la mielosupresión en animales irradiados o que han recibido quimioterapia (159,160). Al igual que estudios in vitro han dado evidencia del efecto estimulante sobre el *Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas* (G-CSF, en inglés), sugiriendo su uso terapéutico combinado para el tratamiento de la mielosupresión inducida por quimioterapia (161).

El rhIL-11 (Neumega), es un compuesto de IL-11 recombinante que se ha elaborado y aprobado por la FDA en los Estados Unidos para su uso en la prevención de la trombocitopenia grave que ocurre después de la quimioterapia del cáncer. Igualmente, se ha observado que el rhIL-11 estimula procesos anti-inflamatorios en una gran variedad de modelos animales tanto en procesos agudos como crónicos, incluyendo la EII, entre varios modelos de enfermedades inflamatorias autoinmunes o sindrómicas (162). Se cree que este efecto lo realiza por medio de la regulación de la línea celular macrofágica que brindaría una mejora en la respuesta de protección a nivel intestinal (163).

El gen de la IL-11, al ser calificado como uno de los genes de la inflamación, ha sido considerado como probable gen de susceptibilidad para la EII (164,165). Sin embargo, no se han encontrado pruebas significativas de su asociación con la etiología de la enfermedad (166). Al igual que su uso terapéutico para tratar la EII tampoco ha generado resultados satisfactorios (167).

2.2. El gen *FSTL5*

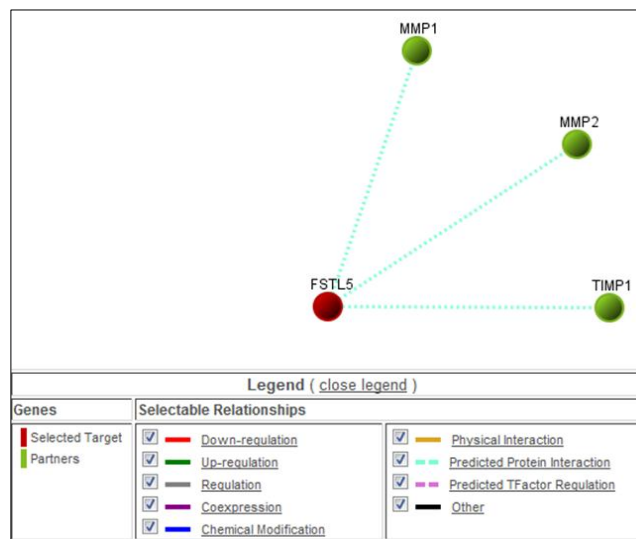
El gen *FSTL5* se encuentra ubicado en el cromosoma 4 en la región q32.3, codifica para una proteína de aproximadamente 845 aminoácidos, la cual, funciona a nivel de la matriz extracelular en probable interacción con otras proteínas del tipo metaloproteasas. Se han reconocido 5 isoformas de las cuales 3 llegan a formar proteínas. Estudios de homología entre especies evidencian que el gen se encuentra conservado en chimpancé, perro, ratón, rata, pollo y

pez cebra. Igualmente, presenta en su estructura proteica varios dominios conservados entre los que destacan uno del tipo de Ig, uno del tipo Kazal_FS, y otros dos de función aún desconocida llamados dominios COG y PTZ.

En el año 2009 un grupo de investigadores estudiando el desarrollo central de la región dorsal en ratones tratando de indagar sobre el mecanismo de quimioatracción de este grupo de células especializadas, lograron demostrar la expresión aumentada en la medula espinal dorsal de seis genes nuevos dentro de los cuales destaca el gen homólogo *fstl5* (168).

Efectivamente poco se conoce sobre su función específica, pero en base al perfil filogenético de la proteína se ha podido establecer empíricamente su posible interacción con otras proteínas (169), y así se ha podido asociar al gen *FSTL5* con otros genes como el *MMP1*, el *MMP2* y el *TIMP1*.

Figura 33. Diagrama de interacción génica entre el gen *FSTL5* y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular.



Los tres genes así relacionados intervienen en el catabolismo de la matriz extracelular, bajo la interacción como metaloproteasas de matriz (MMP). Tanto el gen *MMP1* como el *MMP2* están involucrados en la degradación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos, así como en procesos patológicos como la artritis y el desarrollo de metástasis. La mayoría de proteínas MMP son secretadas como proteínas inactivas que necesitan ser escindidas por proteasas extracelulares para ejercer su función. Específicamente el gen *MMP1* codifica una enzima que descompone el colágeno intersticial tipo I, II y III, y se ha reportado asociado a diversos procesos

fisiológicos y además patológicos como alteraciones cardíacas, procesos de prolapsos pélvicos e incontinencia urinaria, desarrollo de procesos cancerosos, e incluso sordera súbita, entre otros (170-175). El gen *MMP2* codifica una enzima que degrada el colágeno tipo IV, principal componente estructural de las membranas basales. La enzima desempeña un papel en la ruptura del endometrio menstrual, la regulación de la vascularización y la respuesta inflamatoria. Alteraciones en el mismo se han relacionado con ruptura de membranas en embarazos a pretérmino, desarrollo de alteraciones cardíacas, y procesos neoplásicos con capacidad metastásica (176-180), asimismo, mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de Winchester y el síndrome de NAO (nodulosis-artropatía-osteolisis) (181-183).

Por otro lado, el gen *TIMP1* pertenece a la familia de los genes *TIMP* y las proteínas codificadas por esta familia de genes son inhibidores naturales de MMP. Además de su función inhibitoria contra la mayoría de las MMP conocidas, la proteína codificada es capaz de promover la proliferación celular en una amplia gama de tipos celulares y también se le reconoce cierto papel antiapoptótico. La transcripción de este gen es altamente inducible en respuesta a muchas citoquinas y hormonas y se encuentra localizado en el intrón 6 del gen *SINAPSIN I* y se transcribe en dirección opuesta. Se ha relacionado el aumento de la expresión de este gen con la resistencia a la apoptosis inducida por TNF- α en líneas celulares de osteosarcomas (184), igualmente la concentración plasmática del TIMP1 se presenta como un biomarcador para evaluar la respuesta a la primera línea de terapia en cáncer de ovario (185), en el mismo sentido la cuantificación serológica del TIMP1 sirve como indicador para diferenciar pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de pacientes fumadores asintomáticos de bajo riesgo de desarrollar EPOC, encontrándose elevados los niveles de TIMP1 en el primer grupo (186).

Valido para las observaciones anteriormente hechas, aunque el mecanismo por el cual directamente estos genes puedan estar influenciando el desarrollo del fenotipo de mielosupresión en pacientes con EII que reciben AZA, la importancia de sus funciones en procesos metabólicos fisiológicos y su alteraciones descritas en procesos patológicos podrían dar pistas en estudios posteriores sobre el posible papel de estos genes en dicho proceso biológico que condiciona de cierta manera el nivel de respuesta ante el fármaco.

2.3. El gen *TPMT*

Se han descrito en la literatura científica diversas variantes genéticas en *TPMT* que han sido sistemáticamente relacionadas con la aparición de toxicidad al tratamiento con AZA. Es reconocido que pacientes portadores de alelos asociados con baja o nula actividad enzimática de *TPMT*, especialmente en estado de homocigosis, tienen un aumento significativo en el riesgo de desarrollar mielosupresión como resultado de la acumulación excesiva de 6-TGNs, compuestos activos de las tiopurinas; AZA y 6-MP (187,188), por lo que AZA no es recomendado en estos

pacientes. Sin embargo, una reducción de la dosis inicial de 10-15% de la dosis estándar se puede utilizar para el tratamiento de estos casos (189).

En nuestro estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las variantes de *TPMT* y la mielosupresión como efecto secundario al tratamiento con AZA ($p < 0.05$), este resultado está de acuerdo con otros reportes en la literatura donde es reconocido que los pacientes con deficiencia de *TPMT* están en mayor riesgo de desarrollar la mielosupresión (16,95,190,191). Sin embargo, la importancia clínica del sobre la determinación del polimorfismo en *TPMT* previo a la implementación del tratamiento con AZA es un tema que hasta el día de hoy genera controversia. Aunque es sabido que su actividad puede determinar, al menos en parte, la eficacia clínica de la terapia con AZA, el porcentaje de individuos portadores de alelos mutantes es muy bajo en la población general (0,3% en población caucásica).

En el mismo sentido, la presencia de un alelo mutado por sí solo no garantiza la ocurrencia de algún EA, puesto que el espectro de comportamiento en los individuos heterocigotos es muy amplio, desde no sufrir ningún efecto hasta incluso desarrollar alguno con probable compromiso del estado de salud, e incluso la muerte. Razón por la cual la determinación del genotipo de *TPMT* sería especialmente útil solo cuando permita identificar individuos homocigotos para alelos mutados propensos a desarrollar EA, especialmente mielosupresión. Debido a esto, frecuentemente se cuestiona la utilidad de esta herramienta en la aplicación clínica, a pesar de que la FDA (*Food and Drug Administration*), recomienda la determinación del estatus genotípico del paciente previo a la administración de tiopurinas, el verdadero valor es ciertamente limitado pues se ha visto que mutaciones en *TPMT* llegan a ocurrir solo en una tercera parte de los pacientes que desarrollan mielosupresión al recibir AZA (11,192), razón por la cual el recaer solo sobre el genotipo de *TPMT* el seguimiento o la monitorización de la mielosupresión resulta inadecuado.

Por otra parte, no encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de alelos mutantes en *TPMT* y otros EA diferentes a la mielosupresión. Entre los 232 pacientes analizados en nuestro estudio, no se encontraron individuos homocigóticos para las variantes de baja actividad enzimática de *TPMT*. Solo 15 pacientes (6,57%) llegaron a ser heterocigotos y entre ellos, sólo el 33,33% desarrollaron algún tipo de efecto secundario. Estos resultados son comparables con el estudio publicado por Stocco y cols., (104), donde igualmente no encontraron asociación significativa entre la toxicidad relacionada con AZA y el genotipo en *TPMT* ($p = 0,061$), aunque es de considerar que este estudio fue realizado en pacientes pediátricos con EIL.

Datos como estos, sirven como evidencia para demostrar que el genotipo de *TPMT* no puede ser considerado como única causa o, la causa directa de los EA al tratamiento con AZA, ya

que, incluso cuando ellos están presentes no siempre van acompañando el desarrollo de toxicidad.

3. Genes implicados en la eficacia.

Ahora bien en el caso de la evaluación de la eficacia, tres SNPs han resultado resaltantes; el rs17151692 ubicado en el cromosoma 7, el rs6521112 en el cromosoma X y el rs6460195, que se ubica igualmente en el cromosoma 7.

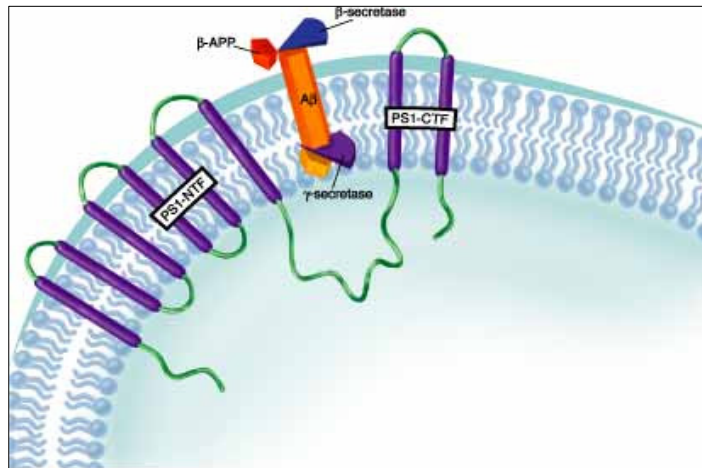
3.1. El gen *PION*

El rs17151692 se encuentra ubicado en la región exónica del gen *PION* (*pigeon* homólogo en *Drosophila*). El gen *PION* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 11.23 (193). Es un gen altamente conservado entre especies; encontrándose en la mayoría de invertebrados como el chimpancé, perro, vaca, ratón, rata, pollo, pez cebra, además de insectos como la *Drosophila Melanogaster*. El gen contiene 31 exones y codifica para una proteína de 854 aminoácidos, la cual, luego de un proceso catalítico libera un fragmento de 16 kDa (GSAP-16K) derivado de 121 residuos de la región C-terminal de la proteína que se conoce como la proteína activadora γ -secretasa (GSAP), componente principal del complejo gamma-secretasa (194).

El complejo de la gamma-secretasa es un grupo de endoproteasas que cataliza la escisión intramembranosa de proteínas integrales de membrana como la APP (proteína precursora beta-amiloide) y los receptores Notch, entre otros. Su descubrimiento, estudio y avances en el entendimiento de su biología molecular se han centrado en su importante papel en el desarrollo de la enfermedad Alzheimer (Alzheimer Disease, AD, en inglés). El complejo es responsable del último paso en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (195), generando los péptidos beta-amiloide(A), que inician el complejo patológico en cascada que conduce por su acumulación a la enfermedad de Alzheimer (196).

Por otro lado, una de las características más resaltantes del complejo gamma-secretasa es su capacidad de procesamiento de más de 60 tipos diferentes de proteínas transmembrana, con la característica de que sus diferentes sustratos no comparten ninguna secuencia de consenso en torno a sus sitios de corte (198,199). Entre este grupo tan diverso de proteínas procesadas por este complejo la más notoria es la proteína Notch.

Figura 34. Diagrama del complejo gamma secretasa. Compuesta por: La PS1 es una proteína de membrana integral con dominios transmembrana múltiples, la proteína BACE/beta-secretasa (azul) y la proteína gamma-secretasa (púrpura).



Tomado de: Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2006;1:88-88-99 (197)

La proteína Notch, pertenece a un grupo de proteínas de receptores transmembrana que regulan el destino de la célula en varios procesos biológicos importantes, durante el desarrollo embrionario, morfogénesis, crecimiento y diferenciación celular de linfocitos T, desarrollo neuronal, regeneración muscular y homeostasis ósea, entre otros (200-203). La familia de Notch incluye genes para 4 receptores altamente conservados desde invertebrados hasta mamíferos, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, y NOTCH4, cuyos ligandos son de al menos cinco tipos y pertenecen a la familia Delta y JAG/Serrate (DSL): JAG1, JAG2, Delta-Like (DLL-1, DLL3 y DLL4). Estas proteínas median señales en una gran cantidad de procesos biológicos, principalmente de desarrollo y diferenciación celular, y son transmitidas a través de contacto directo entre células vecinas que expresan dichos receptores Notch (204).

Todos los receptores tienen un dominio extracelular que contienen múltiples elementos en tándem de factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor, EGF en inglés) y una región intracelular cuya porción citoplasmática está compuesta de una proteína de unión al ADN (RBP-jk) que presenta un dominio RAM (205). Adicionalmente, se encuentran dependiendo del miembro de la familia un grupo de 6 proteínas del tipo ankirina (ANK), delimitadas por dos señales de localización nuclear (NSL), un dominio de transactivación (TAD, en inglés), y por último un dominio rico en residuos de prolina, gultamina, serina y treonina (PEST), que controla la vida media del receptor (206). El estudio de la vía de señalización mediada por Notch ha contribuido

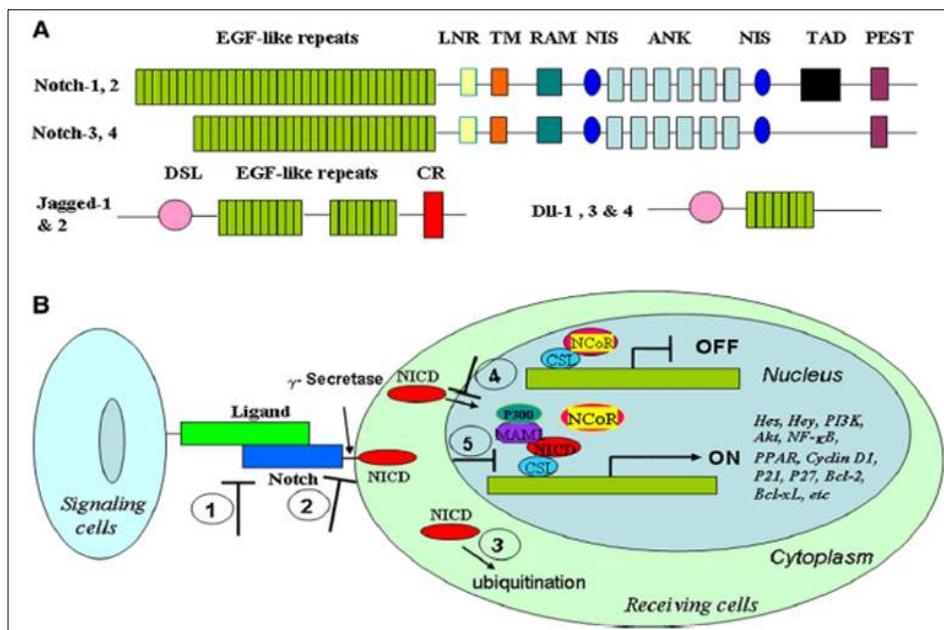
fundamentalmente a la comprensión de un nuevo tipo de proceso de señalización celular, llamado proteólisis intramembranosa regulada (207).

Discusión

La señalización mediada por Notch depende de varios tipos de eventos proteolíticos, donde intervienen proteínas como la furina, proteína encargada del primer corte que genera un receptor heterodimérico (201,208) que se dirige a la superficie de la célula donde es capaz de interactuar con otros ligandos de Notch presente en la superficie de células vecinas, uniéndose a ligandos como Serrate, Lag-2, Delta o Jagged y desencadenando un segundo evento proteolítico mediado por un grupo de proteínas miembros de la familia de proteínas ADAM (ADAM10 y ADAM17) del grupo de las metaloproteasas llamadas TACE, entre otras (209-211).

Otro evento proteolítico dirigido por el complejo gamma secretasa produce la liberación del dominio intracelular de Notch (NICN) (212), el cual se transloca al núcleo donde funciona como un activador transcripcional tras sumarse a las proteínas nucleares CSL(CBF1/Su(H)/Lag-1) y a la proteína de señal de recombinación de inmunoglobulinas kappa J (RBP-Jk), un grupo de proteínas de unión al ADN que median activación o represión de diversos grupos de genes llamados “suppressor of hairless o Hairy/Enhancer of split (HES)”, y LAG1 (213).

Figura 35. Diagrama representando A: Estructura de los receptores de Notch y sus ligandos y B: Esquema de la vía de señalización de Nocth. Receptores y ligandos de Nocth contienen elementos conservados y repeticiones en tándem de EGF. La señalización de Nocth comienza con la unión al receptor, continua por una escisión proteolítica donde interviene la gamma secretasa para liberar el Dominio Intracelular de Nocth (NICD), que se trasloca al núcleo y en unión otros complejos estimula la trascripción de diversos genes.



Tomado de: Biochim Biophys Acta 2010 Dec;1806(2):258-267 (214)

Otros genes regulados por Notch incluyen proteínas y factores que intervienen en el control del ciclo y la supervivencia celular, como: *p21WAF1/CIP1* (un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina que actúa como un sensor y efector de múltiples señales anti-proliferativas), *DELTEX* (un regulador positivo de la actividad de Notch), el factor nuclear- kappa B (*NF-EB*) (un factor de transcripción), ciclina D1 (un sensor mitógenico y activador alostérico de la quinasa dependiente de ciclina-CDK4/6) y *c-myc* (un oncogén y regulador del ciclo celular) (219-223).

Asimismo, la vía de señalización de Notch se identificó inicialmente como un mecanismo modulador del proceso de apoptosis. El complejo DICN interactúa y media la inactivación de p53 por fosforilación (224). Del mismo modo, recientemente, la survivina, una proteína miembro de la familia de proteínas de inhibición de la apoptosis (API) y un inductor de la proliferación celular, se identificó como un nuevo gen estimulado por el Notch (225,226). La estimulación de Notch resulta en una directa estimulación de la transcripción del gen survivin a través de al menos una RPB-Jk a nivel del promotor del gen (227).

Igualmente, se reconoce el papel importante que poseen estas proteínas antes mencionadas (GSAP y la vía Notch), en procesos fisiológicos normales de los organismos multicelulares. Alteraciones en algunos de estos niveles se han asociado con diversos procesos patológicos como el cáncer y algunas enfermedades crónicas con compromiso inmune (228-232).

Por ejemplo, Notch1 se ha encontrado ser un factor mediador de la actividad neoplásica del oncogén *Ras* (230). El *Ras* activo estimula la expresión de Notch1 la cual se ha visto es necesaria para mantener el fenotipo neoplásico en células humanas transformadas tanto in vitro como in vivo. Por otro lado, la proteína Nocth2 ha presentado un comportamiento particular donde se ha visto que su expresión se asocia con mejor tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama (233). En este sentido, O'Neill y cols (234) encontraron que la expresión constitutiva de Notch2 incrementa la apoptosis in vitro en líneas celulares de adenocarcinoma humano, suprime el crecimiento del tumor y disminuye hasta un 60% el número de tumores, tamaño y características necróticas. Contrariamente, cuando la expresión de Notch2 esta disminuida se observa un fenotipo más agresivo de cáncer de mama. En el mismo trabajo se evaluó el papel de la proteína Notch4 en cultivos celulares y se observó que los tumores estimulados por la presencia de esta proteína se comportaban de forma más agresiva y generaban un sistema de vascularización más desarrollado, indicando un papel para Notch 4 de promotor del fenotipo maligno. También, se ha visto que Notch4 tiene la capacidad de subvertir la morfogénesis epitelial normal y promover la de la matriz extracelular (235). Con relación a Notch3, se ha demostrado que su baja regulación suprime de forma significativa la proliferación de líneas celulares de tumores mamarios ErbB2-negativos (236).

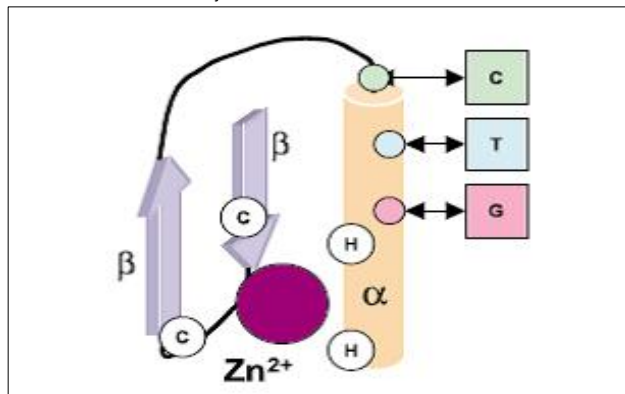
Aportes como estos antes mencionados dan evidencia de que la familia Notch puede funcionar como un oncogén o regulador inhibitorio del crecimiento tumoral en varios tipos de cánceres. Es decir que su papel regulatorio en el ciclo celular es primordial y sumamente controlado. En consideración a esto y al probable papel que jueguen estas proteínas en la resistencia al tratamiento con AZA en pacientes con EII, podemos especular que bajo ciertos modelos de los antes descritos o algún mecanismo nuevo sin descubrir, estas vías de señalización que involucran al complejo de la gamma secretasa y probablemente a la familia Notch brindan la oportunidad a las células de los pacientes resistentes al AZA de evadir el efecto inhibitorio de la mitosis que ejerce el fármaco como consecuencia terapéutica al interferir con el metabolismo celular, especialmente con el metabolismo de las purinas que conlleva a inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Ante esto, algunos de estos nuevos genes podrían estar aportando una fuerza que estimule ya sea, la proliferación y diferenciación celular, o por otro lado que inhiba el proceso de apoptosis.

3.2. El gen *ZNF673*.

Otro SNP que resulto llamativo en relación a la evaluación de la eficacia al tratamiento con AZA fue el rs6521112. Este marcador corresponde a un gen que codifica una proteína del tipo *Dedos de Zinc*, llamado *ZNF673*. El mismo contiene 7 exones y expande en una región de aproximadamente 27.3 kb y está ubicado en el cromosoma X en la región p11.3 (237).

La familia de genes denominados *Proteínas factores de transcripción del tipo dedos de Zinc* (ZFP-TFS), codifican para proteínas que actúan como activadores y represores de la transcripción de múltiples genes, que tienen la característica de estar compuestos por un dominio de la proteína *zinc finger* (ZFP) y cualquiera otro componente de la diferente variedad de efectores de transcripción, los cuales ejercen su efecto modulador sobre las regiones vecinas de cualquier secuencia a la que se une el dominio ZFP (238).

Figura 36. Diagrama de la estructura básica de una proteína dedos de zinc del tipo C2H2. Estas proteínas constan de los dedos en el que dos residuos de histidina en la α -hélice y dos residuos de cisteína en las hojas β interactúan con el átomo de zinc. Residuos de aminoácidos dentro de la α -hélice reconocen la secuencia objetivo en el ADN.



Tomado de: J Mol Biol 2005 Dec 2;354(3):507-519 (238)

Estructuralmente, un gran grupo de las proteínas dedos de zinc contienen un dominio N-terminal que interactúa con otras proteínas y un C-terminal compuesto por el dominio C2H2 del grupo *Kruppel-type* que es por medio del cual se unen al ADN. Asimismo, otro grupo de genes ZFP tienen un dominio N-terminal del grupo KRAB (Kruppel-Associated Box), la cual puede conferir actividad de represión transcripcional mediante el arresto de la proteína KAP-1, que a su vez recluta la maquinaria de la histona deacetilasa y la histona metiltransferasa para la modificación del efecto de la cromatina y el silenciamiento de genes (239). También se han descrito otros tipos de dominios importantes como lo son SCAN, BTB y SET (240-242).

Gracias a su estructura funcional de homo o heterodímeros, los dedos de zinc se pueden vincular de forma lineal al reconocer secuencias de ácidos nucleicos de diferentes longitudes, lo que le confiere un gran número de posibilidades combinatorias para el reconocimiento específico de ADN o ARN, incluso proteínas. Estos se encuentran muy extendidos en la entre las especies y se estima que llegan a representar cerca del 3% de los genes del genoma humano (238,243). Otra ventaja de su tipo de topología funcional, es la no necesidad de simetría de los sitios de unión al ADN, lo que le permite de alguna forma poseer una secuencia común a varios genes (por lo general relacionados funcionalmente), con el objetivo de regular la transcripción de todos estos genes con un único factor de transcripción. Alternativamente, también es posible dirigir una familia de genes relacionados con una sola modulación de la expresión del factor de transcripción en sí mismo que controla la de ellos (238).

Como consecuencia de esta habilidad de adaptación que le brindan sus múltiples conformaciones estructurales, los factores de transcripción *proteínas dedos de zinc* pueden interactuar prácticamente en cualquier mecanismo o ruta biológica en la célula, ya sea regulando o reprimiendo la expresión de algún o grupos de genes que de manera orquestada condicionan la respuesta del organismo ante algún evento en particular. En este sentido, se han podido asociar a diferentes procesos como: el control del crecimiento y diferenciación celular (244-246), participación en procesos malignos o enfermedades crónicas (247-252), funcionando acoplados a hormonas (253-256), e incluso en respuesta ante ciertos medicamentos (257), en especial en drogas antineoplásicas donde sirven como mediadores del proceso apoptótico (258).

Igualmente, mutaciones en algunos genes de la familia de ZFP-KRAB han sido asociados directamente con enfermedades humanas. Alteraciones específicas en alguno de tres genes cercanamente relacionados en la región Xp11 pueden causar retardo mental ligado al X de tipo no sindrómico (*ZNF41*, *ZNF81* y *ZNF674*) (258,259,259).

En nuestro caso, el SNP que surge como sugerente en nuestra evaluación de la eficacia al tratamiento con AZA (rs6521112), se encuentra ubicado en el gen *ZNF673*. El gen *ZNF673* parece ser una duplicación parcial invertida del gen *ZNF674*. La proteína deducida de *ZNF673* contiene los dominios KRAB A y B, pero carece de los dominios de dedos de zinc C-terminal que si se encuentran en *ZNF674*, presumiblemente debido a la presencia de una gran cantidad de codones de terminación en su estructura, evidenciados en el análisis de numerosos ARNm (260). Se ha estimado que los genes *ZNF673* y *ZNF674* comparten cerca de un 80.7% de identidad a nivel de la estructura proteica. En este sentido, se puede pensar que ambos actúan de manera similar, tal como lo demuestra una investigación reciente donde se presenta un paciente con defectos a nivel del desarrollo cognitivo y que al análisis molecular reveló una duplicación de ambos genes, el *ZNF673* y *ZNF674* (261).

Si bien es cierto, hasta el momento estos genes se han asociado con defectos a nivel del retraso del desarrollo y discapacidad intelectual, su mecanismo de acción poco estudiado y su pertenencia a un grupo de genes con tan amplia gama de posibles interacciones, lo hace un buen candidato a estudios posteriores sobre su probable efecto en la eficacia al tratamiento con AZA.

Por ejemplo, en el caso de la resistencia a drogas inmunosupresoras varios son los mecanismos que pueden estar involucrados, entre los cuales se pueden incluir la disminución de la acumulación intracelular del metabolito activo del fármaco, incremento de la concentración intracelular de tior, aumento de la actividad de los sistema de reparación de escisión de nucleótidos del ADN y la disminución de la actividad reparadora del mal apareamiento de bases (mismatch repair, en inglés) (262). En general, se podría hipotetizar en base a la evidencia, que las proteínas responsables de cada uno de estos mecanismos están sobre expresadas en células

resistentes al tratamiento con AZA, como igualmente se ha descrito en el caso de la resistencia a otras drogas antineoplásicas, como por ejemplo al cisplatino (258,263-265).

Entre este grupo de proteínas que actúan como factores de transcripción que estarían regulando este mecanismo de resistencia destacan las proteínas supresoras de tumores p53 y p73, al igual que la oncoproteína c-Myc, y directamente los factores de transcripción ATF4, Clock, YB-1, factor de transcripción de unión a CCAAT del tipo 2 (CTF2), factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA) y *ZNF143* (263,265,266). En consideración de lo observado en estas investigaciones está claro que los factores de transcripción activados en respuesta a algún fármaco inmunosupresor, como lo es el AZA, al igual que el cisplatino, podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la resistencia al mismo. La evidencia emergente sugiere que la complejidad de la respuesta genómica contra los agentes inmunosupresores surgen de la expresión génica conjunta de múltiples factores de transcripción.

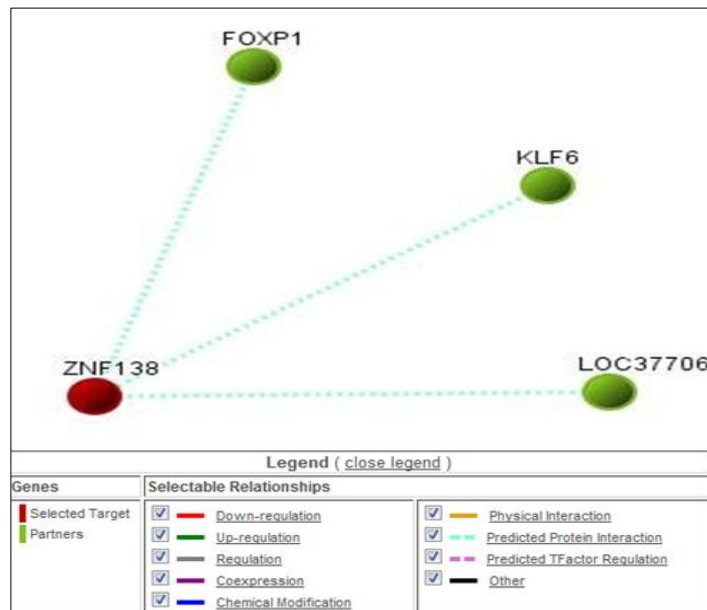
3.3 El gen *ZNF138*

El otro SNP resaltante al evaluar la eficacia corresponde al rs6460195, que se ubica en el gen *ZNF138* (*Zinc Finger Protein 138*), que ha sido mapeado en la región 7q11.21-q11.23; y el análisis de cDNA lo ubican dentro del grupo de la familia Kruppel de proteínas dedos de Zinc, proteínas reguladoras de la transcripción que contienen dominios repetidos en tándem del tipo C2H2, y se cree que participan en la proliferación celular normal y anormal así como en la diferenciación como represor de la expresión de algunos genes (267,268). La delección de la región cromosómica donde se encuentra ubicado este gen se ha asociado a fenotipos como el síndrome de Williams, la enfermedad de pie y mano dividida (SHFD1), y el síndrome de Beckwith-Wiedemann.

Aunque se conoce poco sobre cómo funciona este gen, gracias a la evaluación filogenética de su estructura proteica se ha podido determinar de forma empírica su posible interacción con otras proteínas (169), y así se ha podido asociar al gen *ZNF138* con otros genes como el *FOXP1*, el *KLF6* y otro gen putativo de función aún desconocida.

Discusión

Figura 37. Diagrama de interacción génica entre el gen *ZNF138* y otros genes pertenecientes a diferentes vías de señalización intracelular.



El gen *FOXP1* pertenece a una familia de factores de transcripción (familia FOX), donde 4 proteínas importantes de este grupo (FOX1, FOX2, FOX3 y FOX4), participan en la regulación del crecimiento y diferenciación de los tejidos y la transcripción génica de células de tipo específico durante el desarrollo y la edad adulta. La desregulación de los genes de la familia Fox lleva al desarrollo de trastornos congénitos, enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y a la carcinogénesis (269). Especialmente, el *FOXP1* se ha asociado a múltiples eventos fisiológicos normales, con el desarrollo embriológico con énfasis en el tejido neuronal (270), al igual que en el desarrollo de algunos órganos como el pulmón e hígado (268,271), así como también a eventos más específicos como la linfogénesis (272).

En procesos patológicos ha sido asociado frecuentemente con el desarrollo de cáncer donde se ha reconocido con un gen supresor de tumores (273), cuando su expresión esta disminuida, por ejemplo, en algunos cánceres de mama. Aunque también hay evidencia de que puede actuar como un oncogén frecuentemente asociado a procesos de translocación que conllevan a su sobreexpresión la cual a su vez se asocia con mal pronóstico en algunos tipos de linfomas (274), siendo igual el caso cuando está involucrada la translocación mediada por ERG análoga al *EVT1* en cáncer de próstata (275,276).

Ahora bien, el otro gen en consideración es el *KLF6*, el cual codifica para una proteína conocida como factor 6 del tipo Kruppel (*KLF6*), es una proteína de dedos de zinc que actúa como factor de transcripción y que es expresada de forma ubicua, descubierta y frecuentemente asociado a cáncer de próstata esporádico donde se consigue de forma inactivada, por lo que se le considera un gen supresor de tumores (277,278), igualmente se ha conseguido alterado en otras neoplasias como el cáncer colon rectal (279).

Este gen codifica una proteína nuclear que tiene tres dedos de zinc en el final de su dominio C-terminal, una región central rica en serina/treonina, y un dominio ácido situada en la región N-terminal. Los dedos de zinc de esta proteína son responsables de la unión específica al ADN en los elementos promotores ricos en guanina. La región central podría estar implicada en la activación o vías de regulación postraduccional, y el dominio de ácido N-terminal puede desempeñar un papel importante en el proceso de activación de la transcripción (280).

Se ha visto que en los tumores de próstata, el alelo salvaje de *KLF6* regula de forma positiva el ciclo celular inhibiendo la vía CDK11A (p21) de una manera independiente de TP53 y por ende suprime el crecimiento, mientras que los tumores derivados no mutantes para *KLF6* fallan en regular la vía de p21 o suprimir la proliferación celular en este tipo de cáncer (277).

En este sentido, los defectos en la apoptosis no sólo son un punto importante en la iniciación y progresión del cáncer, sino también son claves para el desarrollo de la quimiorresistencia. Con relación a esto se ha documentado que modificaciones de la compleja red de interacciones proteicas entre las cuales interviene el gen *KLF6*, con la participación de una isoforma variante 1 que tiene actividad proapoptótica (*KLF6-SV1*), está asociada con pobre pronóstico y baja supervivencia en varios tipos de cánceres (281,282). Esta emergente proteína se une y degrada la parte apoptótica de la proteína celular NOXA incrementando la concentración intracelular de la porción prosupervivencia celular de NOXA, Mcl-1, la cual efectivamente bloquea la apoptosis (283).

En este sentido, varias investigaciones han demostrado que la inhibición de dicha variante *KLF6-SV1* disminuye la proliferación celular, invasión a los tejidos, la angiogénesis y la capacidad de formar tumores, además de restaurar la quimiosensibilidad al cisplatino in vivo (282,284), contrario a lo que normalmente regula positivamente la proteína *KLF6*. En el mismo sentido, Sangodkar y cols en el año 2009 demostraron que la quimiorresistencia al tratamiento con cisplatino en cáncer de pulmón se asociaba con incremento en los niveles celulares de *KLF6-SV1* y que estos, al ser disminuidos por medio de la aplicación de RNAi restauraba la sensibilidad a la quimioterapia en las células cancerosas tanto in cultivo como in vivo mediante la inducción de la apoptosis (285).

Igualmente a lo anteriormente descrito, el papel que estos dos genes cumplen en los procesos fisiológicos regulatorios de crecimiento, diferenciación y muerte celular brindan una

oportunidad para seguir indagando sobre su probable papel en la resistencia a las drogas antineoplásicas, especialmente en el caso del AZA y los pacientes con EII. Algunos de estos mecanismos ya descritos u otros aun no descifrados pueden estar regulando de manera negativa la acción terapéutica del fármaco evitando que cumpla su objetivo final que es llevar a la célula afectada a una muerte por apoptosis en algunos individuos portadores de algunas variantes de susceptibilidad en cualesquiera de estos genes descritos o en otros con los que probablemente interactúan.

Hasta el momento la evidencia aquí presentada como resultado del análisis de la región exónica del genoma humano por medio de la estrategia del estudio de genoma completo (GWAS), nos brinda una serie de posibles genes nuevos que podrían dar respuesta o puntualizar sobre algunas rutas metabólicas no conocidas, lo que repercutiría en el esclarecimiento de la biología molecular de cada fenómeno estudiado e incluso de ser posible, ofrecer conocimiento que sirva como base para la creación de nuevas opciones terapéuticas en esta y otras enfermedades con biología similar en su etiología.

VI. Conclusiones

1. Se analizaron 233 pacientes gallegos con EII a tratamiento con AZA en un estudio caso-control (pacientes con aparición de efectos adversos frente a pacientes sin tales efectos adversos, pacientes que respondieron al tratamiento frente a aquellos que no han respondido) de asociación de genoma completo. Los SNPs analizados corresponden a variantes con cambio de aminoácido, con lo que se cubre una gran extensión del exoma humano (20.000 SNPs)
2. Tras una prueba alélica (X^2 y Fisher) de asociación con eficacia y efectos adversos, globales y estratificado, se seleccionaron 106 SNPs entre los estadísticamente significativos y los sugerentes de relevancia estadística para su réplica en una población distinta. También se incluyeron las variantes de los genes *TPMT* e *ITPA* en consideración a los estudios previos, aunque su significación en el estudio resultó menor.
3. Estos 106 SNPs se analizaron en una nueva población de 264 individuos procedentes de la colección ENEIDA, seleccionados de hospitales de Madrid y Cataluña. Igualmente se realizó una prueba alélica y adicionalmente se estimó la probabilidad conjunta, al unir la información de las dos cohortes de pacientes mediante el estadístico CMH (Cochran-Mantel-Haenszel), obteniéndose una probabilidad y un OR combinada con los dos niveles considerados.
4. Ninguno de los SNPs estudiados alcanzan el nivel de significación estipulado al hacer corrección por test múltiples (5×10^{-4} , bonferroni para 92 test). Sin embargo, al evaluar la probabilidad conjunta (CMH) puede apreciarse algunos SNPs que logran obtener un valor significativo ($p < 0.0005$), y con OR en la misma tendencia al estudio inicial. No obstante, en muchos casos esta significación en el CMH se debe al impulso dado por el valor de p en la población inicial. El tamaño muestral parece insuficiente para los efectos que se pretenden detectar. Por otro lado parece descartarse la existencia de uno o pocos loci con gran efecto sobre el fenotipo.
5. Los genes *TPMT* e *ITPA* presentan escasa significación en relación con la aparición de efectos secundarios o eficacia. Únicamente se ha detectado una relación significativa con la mielosupresión, que se pierde en la réplica pero que mantiene una probabilidad conjunta significativa. Una asociación detectada entre *ITPA* y eficacia desaparece al incluir la réplica en el análisis.
6. En el caso de los EA globales ninguno de los SNPs seleccionados muestra una señal significativa que pueda ser considerado como de importancia en esta clase de análisis.

7. Estratificando por EA, aunque para el caso de la pancreatitis no se observa ningún SNP con valores significativos a nivel de la réplica, en el de la mielosupresión, se observa una asociación con el gen *IL6ST*, que presenta una probabilidad bruta en la réplica <0.05 ($p=0.0355$), y una probabilidad conjunta (CMH) de 9.59×10^{-5} y un OR de 3.74 (IC95% 1.86-7.52). También se ha observado cierta relación con el gen *FSTL5*. Por otro lado, aunque sin relevancia estadística en el grupo de la réplica cabe mencionar igualmente la probabilidad conjunta significativa de un grupo de marcadores ubicados en el cromosoma 4; el rs7681441, el rs7681953 y el rs7682031, entre las posiciones cromosómicas 166827334-166827631, sin ningún gen conocido.
8. En relación a la evaluación de la eficacia tres genes muestran resultados significativos. Dos SNPs presentan probabilidades conjuntas en el rango de significación así como unas p en la réplica inferior o alrededor de 0.05 ($p \leq 0.10$): uno en el gen *PION* y otro asociado a un gen codificante de una proteína del tipo dedos de Zinc, el factor de transcripción *ZNF673*. Estos marcadores mostraron una p conjunta de 4.26×10^{-6} y 1.80×10^{-4} , respectivamente, con unos OR en la misma dirección de lo presentado tanto en el estudio original como en la réplica. El tercero corresponde a un SNP que se ubica en el gen *ZNF138*, que presenta una p al análisis conjunto (CMH) de 5.1×10^{-5} y un valor de p en la réplica <0.05 , con ORs de 2.48 (IC95% 1.23-5.02) y de 2.56 (IC95% 1.61-4.06), en la réplica y al análisis conjunto respectivamente.
9. Los resultados aquí obtenidos como derivación del análisis del exoma humano por medio de la estrategia del GWAS nos ofrece un catálogo de nuevos genes que pueden relacionar algunas rutas metabólicas no consideradas previamente, lo cual, brinda una oportunidad para indagar en el esclarecimiento de la biología molecular de cada categoría fenotípica estudiada e incluso podría ofrecer conocimiento que sirva de base para la creación de nuevas opciones terapéuticas en esta y otras enfermedades con biología similar en su etiología

VII. Bibliografía

- (1) Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc* 1957 Oct 19;165(7):835-837.
- (2) Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* 1957 Jun;35(6):339-346.
- (3) ALVING AS, CARSON PE, FLANAGAN CL, ICKES CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956 Sep 14;124(3220):484-485.
- (4) Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 1959 1959;12:52-125.
- (5) Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 2004 Sep;5(9):669-676.
- (6) Daly AK. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nat Rev Genet* 2010 Apr;11(4):241-246.
- (7) Innocenti F, Ratain MJ. "Irinogenetics" and UGT1A: from genotypes to haplotypes. *Clin Pharmacol Ther* 2004 Jun;75(6):495-500.
- (8) Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999 Feb 27;353(9154):717-719.
- (9) Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, et al. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2007 Jan;101(1):113-121.
- (10) Cao Q, Zhu Q, Shang Y, Gao M, Si J. Thiopurine Methyltransferase Gene Polymorphisms in Chinese Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestion* 2009 Feb 28;79(1):58-63.
- (11) Colombel J, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre J, Bonaz B, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000;118(6):1025-1030.
- (12) Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: an update. *Invest New Drugs* 2005;23(6):523-532.
- (13) Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* 2008 Jan;8(1):24-36.

- (14) Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000;61:136-146.
- (15) Lopez-Sanroman A, Bermejo F, Carrera E, Garcia-Plaza A. Efficacy and safety of thiopurinic immunomodulators (azathioprine and mercaptopurine) in steroid-dependent ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(2):161.
- (16) Schutz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 1993 Feb 13;341(8842):436.
- (17) Snow JL, Gibson LE. A pharmacogenetic basis for the safe and effective use of azathioprine and other thiopurine drugs in dermatologic patients. *J Am Acad Dermatol* 1995 Jan;32(1):114-116.
- (18) Maitland-van der Zee AH, de Boer A, Leufkens HG. The interface between pharmacoepidemiology and pharmacogenetics. *Eur J Pharmacol* 2000 Dec 27;410(2-3):121-130.
- (19) Mancinelli L, Cronin M, Sadee W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci* 2000;2(1):E4.
- (20) Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998 Apr 15;279(15):1200-1205.
- (21) Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *Ann Pharmacother* 2008 Jul;42(7):1017-1025.
- (22) Ernst FR, Grizzle AJ. Drug-related morbidity and mortality: updating the cost-of-illness model. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2001 Mar-Apr;41(2):192-199.
- (23) Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozikiewicz PM, Niewinski P, Brockmoller J, et al. Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med* 2003 Mar;81(3):154-167.
- (24) Classen DC, Pestotnik SL, Evans RS, Lloyd JF, Burke JP. Adverse drug events in hospitalized patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1997 Jan 22-29;277(4):301-306.
- (25) Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill's AccessMedicine; 2005.

- (26) Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126(6):1504-1517.
- (27) Ortigosa L. Enfermedad inflamatoria intestinal. 2006. En Velasco Benítez, C. A. (Ed.), *Enfermedades digestivas en niños*. Madrid: Universidad del Valle. p. 121-144.
- (28) Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31(1):1-20.
- (29) Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol* 2005 Jul;21(4):408-413.
- (30) Gollop JH., Phillips S., Melton LJ., Zinsmeister AR. Epidemiologic aspects of Crohn's disease: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1943-1982. *Br Med J* 1988;29(1):49-56.
- (31) Russel MGVM, Dorant E, Volovics A, Brummer RJ, Pop P, Muris JWM, et al. High incidence of inflammatory bowel disease in the Netherlands. *Dis Colon Rectum* 1998;41(1):33-40.
- (32) Wright JP, Marks IN, Jameson C, Garisch JA, Burns DG, Kottler RE. Inflammatory bowel disease in Cape Town, 1975-1980. Part I. Ulcerative colitis. *S Afr Med J* 1983 Feb 12;63(7):223-226.
- (33) Wright JP, Froggatt J, O'Keefe EA, Ackerman S, Watermeyer S, Louw J, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984. *S Afr Med J* 1986 Jul 5;70(1):10-15.
- (34) Ravikumara M, Sandhu BK. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in childhood. *Indian J Pediatr* 2006;73(8):717-721.
- (35) Karban A, Itay M, Davidovich O, Leshinsky-Silver E, Kimmel G, Fidler H, et al. Risk Factors for Perianal Crohn's Disease: The Role of Genotype, Phenotype, and Ethnicity. *Am J Gastroenterol* 2007;102(8):1702-1708.
- (36) Montgomery S, Morris D, Pounder R, Wakefield A. Asian ethnic origin and the risk of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11(5):543.
- (37) Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005 Aug;206:277-295.
- (38) Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005;206(1):296.

- (39) Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911-920.
- (40) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115(1):182-205.
- (41) Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3(5):394-400.
- (42) Thomas GAO, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking—a review. *Am J Gastroenterol* 1998;93(2):144-149.
- (43) Timmer A, Sutherland LR, Martin F. Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. The Canadian Mesalamine for Remission of Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1998 Jun;114(6):1143-1150.
- (44) Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994 May;106(5):1251-1253.
- (45) Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124(1):40-46.
- (46) Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen O, Sorensen I, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324(2):84-88.
- (47) Satsangi J, Rosenberg WMC, Jewell DP. The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6(5):413-416.
- (48) Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, De Meyer A, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111(3):597-603.
- (49) Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Bélahe J, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120(4):816-819.
- (50) Bennett RA, Rubin PH, Present DH. Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991 Jun;100(6):1638-1643.
- (51) Polito J, Childs B, Mellits E, Tokayer A, Harris M, Bayless T. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 1996;111(3):580-586.

- (52) Carbonnel F, Macaigne G, Beaugerie L, Gendre J, Cosnes J. Crohn's disease severity in familial and sporadic cases. *Br Med J* 1999;44(1):91-95.
- (53) Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989 Oct;97(4):900-904.
- (54) Yang H, McElree C, Roth M, Shanahan F, Targan S, Rotter J. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Br Med J* 1993;34(4):517-524.
- (55) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996 Feb 29;379(6568):821-823.
- (56) Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, et al. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;5(10):1679-1683.
- (57) Parkes M, Satsangi J, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Susceptibility loci in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996 Dec 7;348(9041):1588.
- (58) Cavanaugh J, Callen D, Wilson S, Stanford P, Sraml M, Gorska M, et al. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* 1998;62(04):291-298.
- (59) Cavanaugh J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001;68(5):1165-1171.
- (60) Yang H, Ohmen JD, Ma Y, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI. Additional evidence of linkage between Crohn's disease and a putative locus on chromosome 12. *Genet Med* 1999;1(5):194.
- (61) Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1605-1610.
- (62) Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, et al. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998;63(1):95-100.

- (63) Ahmad T, Pesi Tamboli C, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004;126(6):1533-1549.
- (64) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):603-606.
- (65) Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15(6):593.
- (66) Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002 Sep;123(3):679-688.
- (67) Kugathasan S, Fiocchi C. Progress in basic inflammatory bowel disease research. *Seminars in Pediatric Surgery* 2007;16(3):146-153.
- (68) Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307(5710):731-734.
- (69) Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Br Med J* 2004;53(11):1658-1664.
- (70) Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14(2):199-202.
- (71) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314(5804):1461-1463.
- (72) Kugathasan S, Collins N, Maresso K, Hoffmann RG, Stephens M, Werlin SL, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(11):1003-1009.
- (73) Noomen CG, Hommes DW, Fidder HH. Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009;23(2):233-243.
- (74) Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:1319-1323.

- (75) Budarf ML, Labbé C, David G, Rioux JD. GWA studies: rewriting the story of IBD. *Trends Genet* 2009;25(3).
- (76) Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001;121(2):255-260.
- (77) Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117(4):761-769.
- (78) Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(8):753-767.
- (79) von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, et al. Association of inosine triphosphatase 94C> A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin Chem* 2005;51(12):2282-2288.
- (80) Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963 Jun 13;268:1315-1323.
- (81) Elion GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 1993 Jun 23;685:400-407.
- (82) Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43(4):329-339.
- (83) Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002 Aug;51(2):143-146.
- (84) Chan G, Erdmann G, Gruber S, Matas A, Canafax D. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990;30(4):358-363.
- (85) Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118(4):705-713.

- (86) Al Hadithy A, de Boer N, Derijks L, Escher J, Mulder C, Brouwers J. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis* 2005;37(4):282-297.
- (87) Wright S, Sanders D, Lobo A, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Br Med J* 2004;53(8):1123-1128.
- (88) Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996 Sep;39(3):401-406.
- (89) Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Br Med J* 2001;48(5):642-646.
- (90) Marathias V, Sawicki M, Bolton P. 6-Thioguanine alters the structure and stability of duplex DNA and inhibits quadruplex DNA formation. *Nucleic Acids Res* 1999;27(14):2860-2867.
- (91) Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989 Apr 7;244(4900):41-47.
- (92) Krynetski EY, Krynetskaia NF, Gallo AE, Murti KG, Evans WE. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA. *Mol Pharmacol* 2001 Feb;59(2):367-374.
- (93) Fraser A, Orchard T, Jewell D. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Br Med J* 2002;50(4):485-489.
- (94) Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002 4;122(4):904-915.
- (95) Zelinkova Z, Derijks LJJ, Stokkers PCF, Vogels EWM, van Kampen AHC, Curvers WL, et al. Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(1):44-49.
- (96) Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, et al. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 2004;14(3):181.
- (97) Marinaki AM, Duley JA, Arenas M, Ansari A, Sumi S, Lewis CM, et al. Mutation in the ITPA gene predicts intolerance to azathioprine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004 Oct;23(8-9):1393-1397.

- (98) Barabino A, Torrente F, Ventura A, Cucchiara S, Castro M, Barbera C. Azathioprine in paediatric inflammatory bowel disease: an Italian multicentre survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(6):1125.
- (99) Lamers C, Griffioen G, Van Hogezaand R, Veenendaal R. Azathioprine: an update on clinical efficacy and safety in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:111-115.
- (100) George J, Present D, Pou R, Bodian C, Rubin P. The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 1996;91(9):1711-1714.
- (101) Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115(4):813-821.
- (102) Nielsen O, Vainer B, Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(11):1699.
- (103) Ardizzone S, Porro GB. Comparative Tolerability of Therapies for Ulcerative Colitis. *Drug Safety* 2002;25(8):561.
- (104) Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Fontana M, Lionetti P, Decorti G, et al. TPMT genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2005;37(12):940-945.
- (105) Uchiyama K, Nakamura M, Kubota T, Yamane T, Fujise K, Tajiri H. Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment. *J Gastroenterol* 2009;44(3):197-203.
- (106) Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32(5):651-662.
- (107) Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21. 1. *Drug Metab Disposition* 1995;23(3):398-405.
- (108) Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). *Pharmacogenet Genomics* 2008 Oct;18(10):887-893.
- (109) Kham SK, Soh CK, Aw DC, Yeoh AE. TPMT*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol* 2009 Jul;68(1):120-123.

- (110) Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, et al. Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol* 2008 8/1;76(3):404-415.
- (111) Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, et al. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics* 2008 May;18(5):434-438.
- (112) Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT* 3 A, TPMT* 2): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(12):6444-6449.
- (113) Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, et al. Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics* 1999 Oct;9(5):641-650.
- (114) Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997 Jul;62(1):60-73.
- (115) Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998;129(9):716-718.
- (116) Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997;126(8):608-614.
- (117) Ansari AR, Marinaki T, Arenas M, Sumi S, Shobowale-Bakre El-M LK, Woodman I, et al. Mutation in the ITPA gene predicts intolerance to azathioprine. *Gastroenterology* 2003;124:A11.
- (118) Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002;111(4):360-367.
- (119) Cao H, Hegele R. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *J Hum Genet* 2002;47(11):620-622.

- (120) Maeda T, Sumi S, Ueta A, Ohkubo Y, Ito T, Marinaki AM, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab* 2005;85(4):271-279.
- (121) Gearry RB, Roberts RL, Barclay ML, Kennedy MA. Lack of association between the ITPA 94 C> A polymorphism and adverse effects from azathioprine. *Pharmacogenetics* 2004;14(11):779-781.
- (122) Seddik M, Texier F, Ferrari N, Cortot A, Libersa C, Broly F, et al. Thiopurine S-methyltransferase genotyping does not predict azathioprine-induced myelosuppression in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:A311.
- (123) Curvers W, Derijks L, Stokkers P, Vogels E, De Gast J, Pronk I, et al. No predictive value of TPMT genotyping for leukopenia or hepatotoxicity during azathioprine therapy for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:A377.
- (124) Gearry R, Barclay M, Burt M, Collett J, Chapman B, Roberts R, et al. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(4):395.
- (125) Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007 Jun 7;447(7145):661-678.
- (126) Lennard-Jones J. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:2-6.
- (127) Derijks LJ, Gilissen LP, Hoymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Sep 1;24(5):715-729.
- (128) Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004 Sep;2(9):731-743.
- (129) Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W, American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006 Mar;130(3):935-939.
- (130) Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006 Mar;55 Suppl 1:i16-35.

- (131) Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(10):1743.
- (132) De Ridder L, Van Dieren JM, Van Deventer HJ, Stokkers PC, Van der Woude JC, Van Vuuren AJ, et al. Pharmacogenetics of thiopurine therapy in paediatric IBD patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Apr 15;23(8):1137-1141.
- (133) Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007 Mar 1;23(5):644-645.
- (134) Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;348(6):538-549.
- (135) Weersma R, Peters F, Oostenbrug L, Van den Berg A, Van Haastert M, Ploeg R, et al. Increased incidence of azathioprine-induced pancreatitis in Crohn's disease compared with other diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(8):843.
- (136) Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008 Oct 15;17(R2):R143-50.
- (137) Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000 Jun;155(2):945-959.
- (138) Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ, Pask R, Cooper JD, Maier LM, et al. Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study. *Nat Genet* 2005 Nov;37(11):1243-1246.
- (139) McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008 May;9(5):356-369.
- (140) Rodriguez C, Grosgeorge J, Nguyen VC, Gaudray P, Theillet C. Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and possesses a pseudogene on chromosome band 17p11. *Cytogenet Cell Genet* 1995;70(1-2):64-67.
- (141) Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol* 2005 Jun;12(6):545-551.
- (142) Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994 Jan 28;76(2):253-262.

- (143) Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003 Jun 27;300(5628):2101-2104.
- (144) Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O'Hara RM, Jr, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Oct;87(19):7512-7516.
- (145) Patterson PH. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Aug 16;91(17):7833-7835.
- (146) Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T, Bamberger MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Oct;85(10):3932-3936.
- (147) Barbin G, Manthorpe M, Varon S. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 1984 Nov;43(5):1468-1478.
- (148) Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 1997 Jul 1;100(1):158-168.
- (149) Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 2010 Feb 1;120(2):582-592.
- (150) Silver JS, Hunter CA. Gp130 at the Nexus of Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *J Leukoc Biol* 2010 Dec;88(6):1145-1156.
- (151) Fasnacht N, Muller W. Conditional gp130 deficient mouse mutants. *Semin Cell Dev Biol* 2008 Aug;19(4):379-384.
- (152) Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J, Jr, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999 Apr 16;97(2):189-198.
- (153) Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002 Oct;8(10):1089-1097.

- (154) Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, et al. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2002 Oct 7;196(7):979-990.
- (155) Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, et al. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int Immunol* 2010 Feb;22(2):129-139.
- (156) Zucman-Rossi J. Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010 Jul;42 Suppl 3:S235-41.
- (157) Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O'Hara RM, Jr, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Oct;87(19):7512-7516.
- (158) Neben S, Turner K. The biology of interleukin 11. *Stem Cells* 1993 Jul;11 Suppl 2:156-162.
- (159) Schlerman FJ, Bree AG, Kaviani MD, Nagle SL, Donnelly LH, Mason LE, et al. Thrombopoietic activity of recombinant human interleukin 11 (rHuIL-11) in normal and myelosuppressed nonhuman primates. *Stem Cells* 1996 Sep;14(5):517-532.
- (160) Hao J, Sun L, Huang H, Xiong G, Liu X, Qiu L, et al. Effects of recombinant human interleukin 11 on thrombocytopenia and neutropenia in irradiated rhesus monkeys. *Radiat Res* 2004 Aug;162(2):157-163.
- (161) Momose K, Taguchi K, Saitoh M, Yasuda S, Miyata K. Effects of interleukin-11 on the hematopoietic action of granulocyte colony-stimulating factor. *Arzneimittelforschung* 2002;52(11):857-861.
- (162) Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia* 1999 Sep;13(9):1307-1315.
- (163) Putoczki T, Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol* 2010 Dec;88(6):1109-1117.
- (164) Neurath MF, Schurmann G. Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Chirurg* 2000 Jan;71(1):30-40.
- (165) Rodriguez-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007 Nov 14;13(42):5560-5570.

- (166) Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, et al. A polymorphism in the IL11 gene is associated with ulcerative colitis. *Genes Immun* 2002 Dec;3(8):494-496.
- (167) Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002 May;122(6):1592-1608.
- (168) Masuda T, Kai N, Sakuma C, Kobayashi K, Koga H, Yaginuma H. Laser capture microdissection and cDNA array analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the embryonic dorsal spinal cord. *Brain Res* 2009 Jan 16;1249:61-67.
- (169) Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Apr 13;96(8):4285-4288.
- (170) Ghaderian SM, Akbarzadeh Najar R, Tabatabaei Panah AS. Genetic polymorphisms and plasma levels of matrix metalloproteinases and their relationships with developing acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2010 Sep;21(6):330-335.
- (171) Wang LE, Huang YJ, Yin M, Gershenwald JE, Prieto VG, Lee JE, et al. Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinase 1 and risk of cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2011 Jan;47(1):107-115.
- (172) Fang WL, Liang WB, He H, Zhu Y, Li SL, Gao LB, et al. Association of matrix metalloproteinases 1, 7, and 9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to colorectal carcinoma in a Han Chinese population. *DNA Cell Biol* 2010 Nov;29(11):657-661.
- (173) Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Jain S, Singh M. Functional polymorphism of the MMP-1 promoter (-1607 1G/2G) in potentially malignant and malignant head and neck lesions in an Indian population. *Biomarkers* 2010 Dec;15(8):684-692.
- (174) Skorupski P, Miotla P, Jankiewicz K, Rechberger T. MMP-1 and MMP-3 gene encoding polymorphism and the risk of the development of pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence]. *Ginekol Pol* 2010 Aug;81(8):594-599.
- (175) Nam SI, Yu GI, Kim HJ, Park KO, Chung JH, Ha E, et al. A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1. *Laryngoscope* 2011 Jan;121(1):171-175.
- (176) Romero R, Friel LA, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, et al. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). *Am J Obstet Gynecol* 2010 Oct;203(4):361.e1-361.e30.

- (177) Odenbach J, Wang X, Cooper S, Chow FL, Oka T, Lopaschuk G, et al. MMP-2 mediates angiotensin II-induced hypertension under the transcriptional control of MMP-7 and TACE. *Hypertension* 2011 Jan;57(1):123-130.
- (178) Planaguma J, Liljestrom M, Alameda F, Butzow R, Virtanen I, Reventos J, et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2011 Jan;42(1):57-67.
- (179) Garavello W, Maggioni D, Nicolini G, Motta L, Tredici G, Gaini R. Association between metalloproteinases 2 and 9 activity and ERK1/2 phosphorylation status in head and neck cancers: an ex vivo study. *Oncol Rep* 2010 Oct;24(4):1073-1078.
- (180) Mossbock G, Weger M, Faschinger C, Zimmermann C, Schmut O, Renner W, et al. Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis* 2010 Aug 28;16:1764-1770.
- (181) Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 2001 Jul;28(3):261-265.
- (182) Rouzier C, Vanatka R, Bannwarth S, Philip N, Coussement A, Paquis-Flucklinger V, et al. A novel homozygous MMP2 mutation in a family with Winchester syndrome. *Clin Genet* 2006 Mar;69(3):271-276.
- (183) Zankl A, Bonafe L, Calcaterra V, Di Rocco M, Superti-Furga A. Winchester syndrome caused by a homozygous mutation affecting the active site of matrix metalloproteinase 2. *Clin Genet* 2005 Mar;67(3):261-266.
- (184) Tsagaraki I, Tsilibary EC, Tzinia AK. TIMP-1 interaction with alphavbeta3 integrin confers resistance to human osteosarcoma cell line MG-63 against TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 2010 Oct;342(1):87-96.
- (185) Mahner S, Woelber L, Eulenburg C, Schwarz J, Carney W, Jaenicke F, et al. TIMP-1 and VEGF-165 serum concentration during first-line therapy of ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2010 Apr 13;10:139.
- (186) Shaker SB, von Wachenfeldt KA, Larsson S, Mile I, Persdotter S, Dahlback M, et al. Identification of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by measurement of plasma biomarkers. *Clin Respir J* 2008 Jan;2(1):17-25.

- (187) Gearry RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(8):1149.
- (188) Gisbert JP, Gomollon F, Mate J, Pajares JM. Individualized therapy with azathioprine or 6-mercaptopurine by monitoring thiopurine methyl-transferase (TPMT) activity. *Rev Clin Esp* 2002 Oct;202(10):555-562.
- (189) Teml A, Schaeffeler E, Herrlinger KR, Klotz U, Schwab M. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. *Clin Pharmacokinet* 2007;46(3):187-208.
- (190) Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993 Aug;34(8):1081-1085.
- (191) Balis FM, Adamson PC. Application of pharmacogenetics to optimization of mercaptopurine dosing. *J Natl Cancer Inst* 1999 Dec 1;91(23):1983-1985.
- (192) Van Dieren J, Van Vuuren A, Kusters J, Nieuwenhuis E, Kuipers E, Van Der Woude C. ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2005;54(11):1664-1664.
- (193) Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Dec 24;99(26):16899-16903.
- (194) He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer WJ, Hendrick J, et al. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* 2010 Sep 2;467(7311):95-98.
- (195) De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998 Jan 22;391(6665):387-390.
- (196) Selkoe DJ, Wolfe MS. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 2007 Oct 19;131(2):215-221.
- (197) San Miguel A, Rodríguez-Barbero MJ, San Miguel R, Alonso N, Calvo B, Martín-Gil F. Estudio de marcadores biológicos en la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed* 2006;1:88-88-99.

- (198) De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999 Apr 8;398(6727):518-522.
- (199) McCarthy JV, Twomey C, Wujek P. Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell Mol Life Sci* 2009 May;66(9):1534-1555.
- (200) Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Nov 28;103(48):18261-18266.
- (201) Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, Patriub V, Blacklow SC, Sklar J, et al. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* 2000 Mar;20(5):1825-1835.
- (202) Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 1999 Oct 22;286(5440):741-746.
- (203) Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003 Nov 28;302(5650):1575-1577.
- (204) Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010 Dec 28.
- (205) Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, et al. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 2004 Jul 16;279(29):30771-30780.
- (206) Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009 Apr 17;137(2):216-233.
- (207) Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000 Feb 18;100(4):391-398.
- (208) Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997 Jul 25;90(2):281-291.
- (209) van Tetering G, van Diest P, Verlaan I, van der Wall E, Kopan R, Vooijs M. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem* 2009 Nov 6;284(45):31018-31027.
- (210) Bozkulak EC, Weinmaster G. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol* 2009 Nov;29(21):5679-5695.

- (211) Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, et al. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 2010 Apr 7;30(14):4833-4844.
- (212) De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999 Apr 8;398(6727):518-522.
- (213) Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995 Sep 28;377(6547):355-358.
- (214) Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D, et al. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010 Dec;1806(2):258-267.
- (215) Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009 Apr 17;137(2):216-233.
- (216) Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 1999 Apr 15;93(8):2431-2448.
- (217) Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 2008;3:587-613.
- (218) Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 2007 Sep 20;449(7160):351-355.
- (219) Miele L. Notch signaling. *Clin Cancer Res* 2006 Feb 15;12(4):1074-1079.
- (220) Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 2006 Jun;6(4):313-323.
- (221) Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999 Apr 30;284(5415):770-776.
- (222) Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 1999 Dec;181(3):393-409.
- (223) Efstratiadis A, Szabolcs M, Klinakis A. Notch, Myc and breast cancer. *Cell Cycle* 2007 Feb 15;6(4):418-429.

- (224) Kim SB, Chae GW, Lee J, Park J, Tak H, Chung JH, et al. Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation. *Cell Death Differ* 2007 May;14(5):982-991.
- (225) Altieri DC. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 2008 Oct 20;27(48):6276-6284.
- (226) Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009 Nov;35(7):553-562.
- (227) Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Sep;7(9):678-689.
- (228) Oh JH, Yang JO, Hahn Y, Kim MR, Byun SS, Jeon YJ, et al. Transcriptome analysis of human gastric cancer. *Mamm Genome* 2005 Dec;16(12):942-954.
- (229) Rustighi A, Tiberi L, Soldano A, Napoli M, Nuciforo P, Rosato A, et al. The prolyl-isomerase Pin1 is a Notch1 target that enhances Notch1 activation in cancer. *Nat Cell Biol* 2009 Feb;11(2):133-142.
- (230) Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* 2002 Sep;8(9):979-986.
- (231) Niranjana T, Bielez B, Gruenwald A, Ponda MP, Kopp JB, Thomas DB, et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med* 2008 Mar;14(3):290-298.
- (232) Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, et al. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2008 Jan;118(1):217-228.
- (233) Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med* 2004 Nov;14(5):779-786.
- (234) O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, Lincoln A, Nadeau RJ, Leon R, et al. Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *Am J Pathol* 2007 Sep;171(3):1023-1036.
- (235) Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, Montesano R. Expression of an activated Notch4(int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro. *Int J Cancer* 2000 Jun 1;86(5):652-659.

- (236) Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, Satoh H, Azuma S, Hayashi M, et al. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008 Mar 15;68(6):1881-1888.
- (237) Thiselton DL, McDowall J, Brandau O, Ramser J, d'Esposito F, Bhattacharya SS, et al. An integrated, functionally annotated gene map of the DXS8026-ELK1 interval on human Xp11.3-Xp11.23: potential hotspot for neurogenetic disorders. *Genomics* 2002 Apr;79(4):560-572.
- (238) Gommans WM, Haisma HJ, Rots MG. Engineering zinc finger protein transcription factors: the therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command. *J Mol Biol* 2005 Dec 2;354(3):507-519.
- (239) Emerson RO, Thomas JH. Adaptive evolution in zinc finger transcription factors. *PLoS Genet* 2009 Jan;5(1):e1000325.
- (240) Williams AJ, Khachigian LM, Shows T, Collins T. Isolation and characterization of a novel zinc-finger protein with transcription repressor activity. *J Biol Chem* 1995 Sep 22;270(38):22143-22152.
- (241) Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* 1995 Sep;6(9):1193-1198.
- (242) Edelstein LC, Collins T. The SCAN domain family of zinc finger transcription factors. *Gene* 2005 Oct 10;359:1-17.
- (243) Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys* 2010 Feb;43(1):1-21.
- (244) Pan H, Gustafsson MK, Aruga J, Tiedken JJ, Chen J, Emerson CP, Jr. A role for Zic1 and Zic2 in Myf5 regulation and somite myogenesis. *Dev Biol* 2011 Jan 4.
- (245) Lourenco D, Brauner R, Rybczynska M, Nihoul-Fekete C, McElreavey K, Bashamboo A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Jan 10.
- (246) Hesse E, Saito H, Kiviranta R, Correa D, Yamana K, Neff L, et al. Zfp521 controls bone mass by HDAC3-dependent attenuation of Runx2 activity. *J Cell Biol* 2010 Dec 27;191(7):1271-1283.

- (247) Fan Y, Tao JH, Zhang LP, Li LH, Ye DQ. The association between BANK1 and TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Int J Immunogenet* 2011 Jan 5.
- (248) Sun C, Van Ghelue M, Tranebjaerg L, Thyssen F, Nilssen O, Torbergesen T. Myotonia Congenita and Myotonic Dystrophy in the Same Family: Coexistence of a CLCN1 Mutation and Expansion in the CNBP (ZNF9) Gene. *Clin Genet* 2010 Dec 15.
- (249) Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol* 2010 Dec;41(12):1794-1801.
- (250) Yang L, Wang H, Kornblau SM, Graber DA, Zhang N, Matthews JA, et al. Evidence of a role for the novel zinc-finger transcription factor ZKSCAN3 in modulating Cyclin D2 expression in multiple myeloma. *Oncogene* 2010 Nov 8.
- (251) Inaguma S, Kasai K, Ikeda H. GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin. *Oncogene* 2010 Oct 25.
- (252) Soroczynska-Cybula M, Bryl E, Smolenska Z, Witkowski JM. Varying expression of four genes sharing a common regulatory sequence may differentiate rheumatoid arthritis from ageing effects on the CD4(+) lymphocytes. *Immunology* 2011 Jan;132(1):78-86.
- (253) Quach JM, Walker EC, Allan E, Solano M, Yokoyama A, Gillespie MT, et al. Zinc finger protein 467 is a novel regulator of osteoblast and adipocyte commitment. *J Biol Chem* 2010 Dec 1.
- (254) Correa D, Hesse E, Seriwatanachai D, Kiviranta R, Saito H, Yamana K, et al. Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 2010 Oct 19;19(4):533-546.
- (255) Kumar PA, Kotlyarevska K, Dejhmaron P, Reddy GR, Lu C, Bhojani MS, et al. Growth hormone (GH)-dependent expression of a natural antisense transcript induces zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) in the glomerular podocyte: a novel action of gh with implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 2010 Oct 8;285(41):31148-31156.
- (256) Szelei J, Soto AM, Geck P, Desronvil M, Prechtl NV, Weill BC, et al. Identification of human estrogen-inducible transcripts that potentially mediate the apoptotic response in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000 Mar;72(3-4):89-102.
- (257) Peppi M, Kujawa SG, Sewell WF. A corticosteroid-responsive transcription factor, promyelocytic leukemia zinc finger protein, mediates protection of the cochlea from acoustic trauma. *J Neurosci* 2011 Jan 12;31(2):735-741.

- (258) Desai S, Maurin M, Smith MA, Bolick SC, Dessureault S, Tao J, et al. PRDM1 is required for mantle cell lymphoma response to bortezomib. *Mol Cancer Res* 2010 Jun;8(6):907-918.
- (259) Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Banning MJ, Kalscheuer VM, Chelly J, et al. Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 2004 May;41(5):394-399.
- (260) Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, et al. ZNF674: a new kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006 Feb;78(2):265-278.
- (261) Ramaswamy V, Castillo M, Bolduc FV. Developmental disability: duplication of zinc finger transcription factors 673 and 674. *Pediatr Neurol* 2010 Sep;43(3):209-212.
- (262) Kohno K, Uchiumi T, Niina I, Wakasugi T, Igarashi T, Momii Y, et al. Transcription factors and drug resistance. *Eur J Cancer* 2005 Nov;41(16):2577-2586.
- (263) Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Yoshida Y, Tanabe M, Yoshida T, et al. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005 Jan;5(1):15-27.
- (264) Tanabe M, Izumi H, Ise T, Higuchi S, Yamori T, Yasumoto K, et al. Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003 Dec 15;63(24):8592-8595.
- (265) Wakasugi T, Izumi H, Uchiumi T, Suzuki H, Arao T, Nishio K, et al. ZNF143 interacts with p73 and is involved in cisplatin resistance through the transcriptional regulation of DNA repair genes. *Oncogene* 2007 Aug 9;26(36):5194-5203.
- (266) Uchiumi T, Knag D. Cisplatin sensitivity transcriptional factor and mitochondrial DNA maintenance protein]. *Rinsho Byori* 2009 Oct;57(10):978-986.
- (267) Tommerup N, Vissing H. Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* 1995 May 20;27(2):259-264.
- (268) Shu W, Yang H, Zhang L, Lu MM, Morrisey EE. Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *J Biol Chem* 2001 Jul 20;276(29):27488-27497.
- (269) Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004 Nov;25(5):1495-1500.

(270) Tamura S, Morikawa Y, Iwanishi H, Hisaoka T, Senba E. Expression pattern of the winged-helix/forkhead transcription factor Foxp1 in the developing central nervous system. *Gene Expr Patterns* 2003 May;3(2):193-197.

(271) Morrisey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell* 2010 Jan 19;18(1):8-23.

(272) Hu H, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, et al. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol* 2006 Aug;7(8):819-826.

(273) Shimizu K, Kato A, Hinotsume D, Shigemura M, Hanaoka M, Shimoichi Y, et al. Reduced expressions of Foxp1 and Rassf1a genes in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Cancer Lett* 2006 May 18;236(2):186-190.

(274) Koon HB, Ippolito GC, Banham AH, Tucker PW. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007 Jul;11(7):955-965.

(275) Goatly A, Bacon CM, Nakamura S, Ye H, Kim I, Brown PJ, et al. FOXP1 abnormalities in lymphoma: translocation breakpoint mapping reveals insights into deregulated transcriptional control. *Mod Pathol* 2008 Jul;21(7):902-911.

(276) Hermans KG, van der Korput HA, van Marion R, van de Wijngaart DJ, Ziel-van der Made A, Dits NF, et al. Truncated ETV1, fused to novel tissue-specific genes, and full-length ETV1 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008 Sep 15;68(18):7541-7549.

(277) Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, et al. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001 Dec 21;294(5551):2563-2566.

(278) Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF, Jr, et al. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003 Apr;162(4):1349-1354.

(279) Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, et al. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004 Apr;126(4):1090-1103.

(280) Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A, Patriato LC. A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem* 1997 Apr 4;272(14):9573-9580.

(281) Narla G, DiFeo A, Fernandez Y, Dhanasekaran S, Huang F, Sangodkar J, et al. KLF6-SV1 overexpression accelerates human and mouse prostate cancer progression and metastasis. *J Clin Invest* 2008 Aug;118(8):2711-2721.

(282) DiFeo A, Feld L, Rodriguez E, Wang C, Beer DG, Martignetti JA, et al. A functional role for KLF6-SV1 in lung adenocarcinoma prognosis and chemotherapy response. *Cancer Res* 2008 Feb 15;68(4):965-970.

(283) Difeo A, Huang F, Sangodkar J, Terzo EA, Leake D, Narla G, et al. KLF6-SV1 is a novel antiapoptotic protein that targets the BH3-only protein NOXA for degradation and whose inhibition extends survival in an ovarian cancer model. *Cancer Res* 2009 Jun 1;69(11):4733-4741.

(284) DiFeo A, Narla G, Martignetti JA. Emerging roles of Kruppel-like factor 6 and Kruppel-like factor 6 splice variant 1 in ovarian cancer progression and treatment. *Mt Sinai J Med* 2009 Dec;76(6):557-566.

(285) Sangodkar J, DiFeo A, Feld L, Bromberg R, Schwartz R, Huang F, et al. Targeted reduction of KLF6-SV1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2009 Dec;66(3):292-297.

Referencias electrónicas consultadas:

- <http://frodo.wi.mit.edu/>
- <http://cstl.nist.gov/div831/strbase/AutoDimerHomepage/>
- <http://people.chgv.lsrc.duke.edu/~dg48//WGAViewer/screenshots.php>
- <http://www.sabiosciences.com/genenetwork/genenetworkcentral.php>
- <http://snpper.chip.org/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>
- <http://bioinformatics.cesga.es/gdf/>
- <http://www.e-biometria.com/g-stat/index.html>

VIII. Anexos

1 ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACIÓN INICIAL.

PROYECTO: FARMACOGENÉTICA EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

INTRODUCCIÓN

Se solicita su participación en un proyecto de investigación destinado a estudiar aspectos relacionados con el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Cronh/Colitis Ulcerosas), a partir de una pequeña muestra de sangre, siendo su participación absolutamente voluntaria y entendiendo que no afectará a la atención médica que le proporcionen sus médicos. Otorgando su consentimiento para estudiar estas muestras de sangre Ud. contribuirá a un mejor entendimiento sobre la eficacia del tratamiento en esta enfermedad.

NATURALEZA Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

La finalidad de este proyecto en el cual usted participará voluntariamente es:

- Caracterizar variaciones en genes implicados en las rutas metabólicas del fármaco Azatioprina que puedan predecir la tolerancia y respuesta al mismo.

PROCEDIMIENTOS DEL PROYECTO

Inmediatamente tras la extracción de sangre se asignará a las muestras un código alfanumérico que será el único identificador de las mismas. El equipo investigador estará formado por miembros del laboratorio de investigación de la Fundación Gallega de Medicina Genómica y al Servicio de Aparato Digestivo.

RIESGOS, BENEFICIO, COMPENSACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD

Su participación en este estudio no le acarreará ningún riesgo adicional. La posibilidad de estudiar estas muestras puede beneficiar en el futuro a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación. Toda información que se obtenga de analizar las muestras, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en la investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia.

NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS

Las implicaciones médicas de los resultados del análisis de las muestras de sangre sólo serán conocidas cuando se haya completado el proyecto de investigación. Su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación o divulgación de los resultados.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Al firmar el consentimiento informado confirmará que desea participar de forma voluntaria. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento. Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL

Usted puede contactar con cualquier miembro del equipo de investigación si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente.

PROYECTO: FARMACOGENÉTICA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS FARMACOGENÉTICAS

Yo _____ (nombre del paciente),

Con fecha de nacimiento, _____

Lugar de origen, _____

He leído la información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el proyecto y he recibido suficiente información sobre el mismo. Al considerar toda esta información he decidido autorizar a la Fundación Gallega de Medicina Genómica a realizar análisis genéticos moleculares de mi ADN relacionados con la búsqueda de marcadores genéticos de respuesta y de riesgo de efectos secundarios en relación con el tratamiento con Azatioprina.

Comprendo que mi participación es voluntaria, que puedo retirar mi consentimiento; Cuando quiera, sin tener que dar explicaciones, y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Aunque se espera mejore la eficacia y disminuya los riesgos asociados al mismo en el futuro, no cabe esperar un resultado que me afecte en el tratamiento actual. Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

Firma del paciente

Fecha

Lugar

Yo, miembro del equipo investigador, he explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al paciente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.


Firma del investigador

Fecha

Lugar

Se entrega copia de este documento al paciente.

2 ANEXO: CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES DEL GRUPO DE RÉPLICA:



ENEIDA

Estudio
Nacional en
ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL sobre
Determinantes Genéticos y
Ambientales

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Estudio Nacional en Enfermedad Inflamatoria Intestinal sobre Determinantes Genéticos y Ambientales.

1. Objetivo

Este documento tiene por objeto pedirle su consentimiento para ser incluido en un estudio encaminado a analizar factores ambientales y genéticos que pueden estar implicados en la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal y condicionar el curso de la misma.

Usted o uno de sus familiares ha sido diagnosticado inequívocamente de una enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis linfocítica o colitis colágena) que se caracteriza por producir una inflamación en el intestino de causa desconocida. En los últimos años se ha identificado la relación de factores ambientales y de varios genes con la aparición y/o curso de la enfermedad inflamatoria intestinal, pero el conocimiento que tenemos hasta la actualidad es sólo parcial y se requieren de nuevos estudios para una completa caracterización de todos los factores genéticos y de la interacción entre estos y los factores del ambiente (por ejemplo el tabaco o las infecciones intestinales).

Además, el análisis de las características clínicas de la enfermedad y de factores genéticos también nos puede ayudar a comprender los factores que condicionan la respuesta a determinados tratamientos.

Para la realización de los efectos de factores ambientales y de determinadas características de su enfermedad sobre el curso de la misma precisamos recoger la información clínica concerniente a su enfermedad concreta, en caso de que usted la padezca. Si usted es un familiar de un paciente y no padece una enfermedad inflamatoria intestinal, no será necesario recoger ninguna información adicional.

Para el análisis de los factores genéticos necesitamos analizar el ADN que se halla en las células que circulan por la sangre (leucocitos). Con este ADN sólo pretendemos analizar la presencia de variantes genéticas que condicionen la aparición y/o curso de la enfermedad inflamatoria intestinal y la respuesta a los tratamientos. El ADN extraído será guardado para utilizarlo sólo en proyectos autorizados por un comité de Ética e Investigación Clínica y por los responsables del proyecto ENEIDA.

2. Descripción de los procedimientos

En caso de que usted nos otorgue autorización, algunos de los datos de su historia clínica y otros que usted nos facilite específicamente para este proyecto serán transferidos a una base de datos construida a tal fin. Los datos serán transmitidos de forma anónima, bajo un código, de forma que sólo el médico que le atiende podrá saber que le pertenecen a usted en particular. Los datos transmitidos de forma anónima serán almacenados en un servidor remoto. Podrán tener acceso a los datos clínicos de los pacientes participantes, convenientemente anonimizados, los investigadores que presenten un proyecto de investigación que haya sido aprobado por un comité de ética, una vez este sea aprobado también por el comité científico del proyecto ENEIDA formado por nueve médicos pertenecientes a nueve centros hospitalarios españoles.

Si usted participa también en el estudio de los factores genéticos necesitamos obtener una muestra de sangre. Para este estudio se extraerán 25 ml de sangre. Con este volumen de sangre podemos obtener las células suficientes que nos permitirán la realización de los estudios genéticos.

Con la finalidad de asegurar en todo momento una fuente inagotable de ADN para la realización de estudios genéticos en torno a la enfermedad inflamatoria intestinal una parte de los leucocitos obtenidos en esta muestra serán condicionados para que puedan replicarse en el laboratorio en un proceso que se denomina "creación de líneas inmortalizadas". Estas células constituirán una fuente de su ADN siempre que sea requerida sin precisar de nuevas extracciones.

Las muestras de ADN o de células inmortalizadas serán almacenadas en un biobanco que ha sido acreditado tras verificar que cumple con todos los requisitos legales vigentes, ubicado en el Hospital Clinic de Barcelona. Los responsables de la custodia de las muestras serán los Dros Julián Panés Díaz y Eugeni Doménech. Se garantiza la conservación de estas muestras por un período de al menos cinco años.

1/3



3. Beneficios

Usted no obtendrá ningún beneficio directo de la participación en este estudio. Tampoco recibirá usted por su participación en el mismo ninguna compensación económica. En el futuro la información obtenida en este estudio puede permitir un mejor conocimiento de las causas de la enfermedad inflamatoria intestinal y un mejor tratamiento de la misma, que supondría un beneficio para los pacientes afectados de esta enfermedad.

Si usted desea saber los resultados diagnósticos que se obtengan en estas investigaciones referidas a su muestra de ADN, estos le serán comunicados.

4. Riesgos

Si usted participa en el estudio de factores ambientales y características clínicas de la enfermedad, esta participación no comporta para usted ningún riesgo.

Si usted participa también en el estudio de los factores genéticos será sometido a una punción venosa para este estudio.

Debe saber que:

- Cualquier punción venosa supone un riesgo de infección aun cuando se realice en las condiciones de máxima asepsia.
- La punción venosa puede provocarle dolor en la zona del pinchazo.
- La punción venosa puede provocarle un hematoma.
- Algunas punciones provocan un proceso inflamatorio local (flebitis), remediable con tratamiento local, pero que en raras ocasiones puede desencadenar un proceso tromboembólico más grave.

5. Participación voluntaria

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento si así lo cree conveniente, sin tener que especificar los motivos, y sin que su decisión perjudique en el futuro la atención médica que merece. En el momento que usted decida retirarse del estudio, las muestras de su ADN remanente serán destruidas.


6. Confidencialidad

Toda la información resultante de su participación en este estudio será almacenada y analizada en un ordenador y se tratará de forma confidencial según la legislación vigente. El proceso de transmisión y almacenamiento de datos ha sido aprobado por la Agencia de Protección de Datos. Los resultados del estudio pueden ser publicados en revistas médicas. Sin embargo, su nombre no aparecerá en ningún documento.

7. Información

El responsable del estudio Dr
es médico de plantilla de este Hospital, y le proporcionará toda la información complementaria que usted necesite. Podrá contactar con él llamando al teléfono La muestra obtenida no será utilizada para ninguna finalidad empresarial, o que pueda implicar la obtención de beneficios económicos.

Médico que participa en la obtención del consentimiento
.....

 **ENEIDA** Estudio Nacional de ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL sobre Determinantes Genéticos y Ambientales

CONSENTIMIENTO INFORMADO Código del estudio: **ENEIDA**

Yo,,
(Nombre y apellidos en mayúsculas)

1. He leído la hoja de consentimiento que se me ha entregado.
2. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He hablado con,
(Nombre del investigador en mayúsculas)

Comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria.
2. Que este análisis no me supone ningún beneficio.
3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos.
4. Que la información obtenida en este estudio es confidencial.

Participo sólo en el estudio de factores ambientales y características de la enfermedad.
 Participo en el estudio de factores genéticos.

En caso de participar en el estudio de factores genéticos, deseo recibir los resultados diagnósticos de los análisis de mi muestra de ADN.

Sí No

.....
(Fecha)
(Firma del participante)

.....
(Fecha)
(Firma del investigador)

3/3

3 ANEXO: LISTADO DE SNPs SELECCIONADOS PARA LA RÉPLICA:

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|
| rs12453150 | rs4646491 | rs10761073 | rs2280718 | rs138593 | rs3810651 | rs11588069 |
| rs9943012 | rs2074468 | rs3128917 | rs1800124 | rs1042364 | rs2438101 | rs2288420 |
| rs2297773 | rs16942798 | rs12435621 | rs1338314 | rs2301788 | rs7681441 | rs2297809 |
| rs10941112 | rs17060979 | rs1609860 | rs9464 | rs11636318 | rs7681953 | rs1637214 |
| rs1545133 | rs6048760 | rs6793295 | rs2297980 | rs17183577 | rs7682031 | rs3812909 |
| rs7041 | rs6063377 | rs1637215 | rs1053019 | rs441827 | rs701865 | rs678892 |
| rs11588069 | rs17151692 | rs6521112 | rs162036 | rs1065464 | rs8058694 | rs17007988 |
| rs11723381 | rs3746736 | rs1043863 | rs6516605 | rs3729961 | rs17021270 | rs6767658 |
| rs13157270 | rs1851724 | rs2076671 | rs3735478 | rs1126673 | rs1537232 | rs7870554 |
| rs4272850 | rs6427437 | rs10162272 | rs7499843 | rs17782413 | rs7039068 | rs2515848 |
| rs17592438 | rs11212684 | rs6907580 | rs8106117 | rs12981996 | rs823172 | rs1126671 |
| rs562092 | rs12927214 | rs11919970 | rs6841334 | rs3749598 | rs4808368 | rs4792311 |
| rs7160694 | rs2820289 | rs1713457 | rs2124489 | rs1154400 | rs12183109 | rs10735005 |

4 ANEXO: LISTADO DE INICIADORES UTILIZADOS EN LAS REACCIONES iPLEX:

POLIMORFISMOS TIPADOS POR SEQUENOM (ENSAYO AMPLIFICADO)

| WELL | SNP_ID | 2nd-PCR | 1st-PCR | Tm |
|------|----------|--------------------------------|--------------------------------|------|
| W1 | 1043863 | ACGTTGGATGAACACAGGCTCCGCACAG | ACGTTGGATGCATTAGAAGAATTGAGGGAC | 51.5 |
| W1 | 17592438 | ACGTTGGATGTGGTCTTGTGCCCATGTTC | ACGTTGGATGTGCCCCAAAATATAGAAG | 46 |
| W1 | 8058694 | ACGTTGGATGTTTCTGGGACCAGGCGAAG | ACGTTGGATGAAATGGCCTCTTGTGCCCTG | 52.4 |
| W1 | 17060979 | ACGTTGGATGCAGCTGGGAAGGCTCACA | ACGTTGGATGTTTTGTTCTGGTCCCACCG | 48.3 |
| W1 | 2297773 | ACGTTGGATGCCCGATTCCGTGCATACT | ACGTTGGATGACATGCGGCTGACCGAGTTG | 48.9 |
| W1 | 17183577 | ACGTTGGATGGTGTATGTGTGATTGCC | ACGTTGGATGCATTCTGGATTATCCCTC | 46.9 |
| W1 | 1713457 | ACGTTGGATGTGAGTGTGTGGCGGACACTA | ACGTTGGATGGTCTCCACTGTTACCAGCAG | 46.9 |
| W1 | 9943012 | ACGTTGGATGGAGCCCACTCTCCAGTAT | ACGTTGGATGATAATGCTGCAGAACCTGCG | 49.7 |
| W1 | 4272850 | ACGTTGGATGGATTCTTTTGGCAGGACAC | ACGTTGGATGACCTTGATAGGCATGGCAAC | 46.1 |

Farmacogenómica del AZA
Anexos

| | | | | |
|----|----------|--------------------------------|---------------------------------|------|
| W1 | 1851724 | ACGTTGGATGCGTCTGACTGTGGTGATAAC | ACGTTGGATGTAAGTGTCTCTTGAGACTTG | 53.4 |
| W1 | 7041 | ACGTTGGATGTTTTTCAGACTGGCAGAGCG | ACGTTGGATGCTTGTTAACCAGCTTTGCC | 46.2 |
| W1 | 7681441 | ACGTTGGATGAGAGGAGATATCGACTCAGG | ACGTTGGATGGCTTCCCAATGTTTTACCC | 45.9 |
| W1 | 562092 | ACGTTGGATGACACCTTTCCGACCTTTGTG | ACGTTGGATGCTGCAGAACCCAAATTGGTG | 47.8 |
| W1 | 7870554 | ACGTTGGATGAGCGAGGGCCAGTAAACAC | ACGTTGGATGGCTGCATTGTGATCTGCTTC | 46.1 |
| W1 | 138593 | ACGTTGGATGGCACAGATCTTAGCACAGTT | ACGTTGGATGAATGCCTCTACCTTGAGGG | 47 |
| W1 | 2280718 | ACGTTGGATGTTGTTGAGTGGCGCTGAG | ACGTTGGATGAACAGACGTACAGACGGCAG | 46.4 |
| W1 | 7160694 | ACGTTGGATGTAGGAAGACTTCGAGTTCC | ACGTTGGATGATCAGATCACTTCCGCTGTC | 53.1 |
| W1 | 6521112 | ACGTTGGATGGAATTGTAGTTGAACACCC | ACGTTGGATGCCTGGGGTAGGCCTTTTATA | 48 |
| W1 | 1154400 | ACGTTGGATGTGCACCCTGGAACGCACAA | ACGTTGGATGCTTGAATGGCTCCAACCG | 50.8 |
| W1 | 6048760 | ACGTTGGATGGCCTGGCAACCCTCATTTTT | ACGTTGGATGAGGTGTCCCAGGACCAAAA | 49.4 |
| W1 | 1545133 | ACGTTGGATGGAACTCTGTTTCTCAGATG | ACGTTGGATGCCTAGGTAGTTAAGGACCTG | 47.4 |
| W1 | 2076671 | ACGTTGGATGTTGTGCCCTCAAAGGCTCTC | ACGTTGGATGTTGTGGCCAAGAGACACATC | 56.7 |
| W1 | 6427437 | ACGTTGGATGTTACTGCCTTATCAGCCCAC | ACGTTGGATGCTGAGAAAGGTTCTGGGTAG | 53.9 |
| W1 | 10761073 | ACGTTGGATGGAAGAAAGCCTTCTCTACC | ACGTTGGATGACATAAAAAGGGCTGAACCG | 54.7 |
| W1 | 17151692 | ACGTTGGATGAATGGACTGTCTTACCCTC | ACGTTGGATGATGAAGATTATGTTTCCTC | 50.9 |
| W1 | 1126673 | ACGTTGGATGACTTATTAATGTTTTATTGT | ACGTTGGATGGCTCCTGGCATCTTCAAAAG | 45.1 |
| W1 | 10162272 | ACGTTGGATGTATAAGTAATACTGATGAAG | ACGTTGGATGCATTTGAACCAGGTAATAATC | 45.4 |
| W1 | 12927214 | ACGTTGGATGAGCTCAAGCGTTGTACCA | ACGTTGGATGGTCTCACTCAGTGCCTTCG | 59.1 |
| W1 | 2301788 | ACGTTGGATGGACCTGCTTATTCTGACCAC | ACGTTGGATGCTCTTGGGCCCTGCAGTG | 60.4 |
| W1 | 701865 | ACGTTGGATGTCATGTCCAGCAGTCCAATG | ACGTTGGATGGACAGTTTCACAAAGCGCTC | 48.1 |
| W1 | 1637214 | ACGTTGGATGGGGTGTAGAAACATCATAAC | ACGTTGGATGCACCTGTCTCAAAGATCTA | 51.6 |
| W1 | 1609860 | ACGTTGGATGCTTCCAATGGGCTTCTGCAC | ACGTTGGATGCTCACCTCATTGTTGCTCTC | 52.8 |
| W1 | 6793295 | ACGTTGGATGGGCAATAAACCTAAACCGAC | ACGTTGGATGCCATCACTTTGAATACATACC | 51.9 |
| W1 | 4808368 | ACGTTGGATGTGTTTGGAGACCCCATGAC | ACGTTGGATGCAGCTGGTCTCTGTTTAAAG | 56.9 |
| W1 | 10735005 | ACGTTGGATGACAGGAAGGCACATTTACCG | ACGTTGGATGACACCATCACCACCATCTTG | 51.7 |

Farmacogenómica del AZA

Anexos

| | | | | |
|----|----------|---------------------------------|---------------------------------|------|
| W2 | 2288420 | ACGTTGGATGTTGAGGATGCCTGGGCTGCCG | ACGTTGGATGCCATCCAGGCCACAAGTT | 52.8 |
| W2 | 1800124 | ACGTTGGATGTGCAGCATTCCCAGAATAC | ACGTTGGATGTGATGCACCACGTTAAGAAC | 45 |
| W2 | 2438101 | ACGTTGGATGGGTATCAGCTGCACGAACAC | ACGTTGGATGCGCTATACCTACCAGCAAAG | 51.3 |
| W2 | 11212684 | ACGTTGGATGCTTCTTGCTGTGAAATGCC | ACGTTGGATGTTTGGCAGTACTTCGCTGTG | 49.5 |
| W2 | 2515848 | ACGTTGGATGTTCTGGAATCCTTGACG | ACGTTGGATGTGATCTCCTGTTGGCTTTC | 52 |
| W2 | 10941112 | ACGTTGGATGGGCTCTTTTGACGCACAC | ACGTTGGATGGGCATCTACCCCAATTAATAC | 53.2 |
| W2 | 7499843 | ACGTTGGATGAGAGAGAAGAGCCTTCGATG | ACGTTGGATGCAACCTCTATTCTGCATCC | 47.9 |
| W2 | 6907580 | ACGTTGGATGATGTTCTCAGAAAGACTC | ACGTTGGATGGAGACTTACTACCCAACAC | 49.1 |
| W2 | 1126671 | ACGTTGGATGGGCCGATTATTAGCTCCTCT | ACGTTGGATGATTGGAGTAGCTGCTGGTAG | 45.7 |
| W2 | 16942798 | ACGTTGGATGGTGTGTGAGAAAGCGTTTT | ACGTTGGATGAGGTGGTGTCCATCATGTTT | 49.6 |
| W2 | 3735478 | ACGTTGGATGTTCTTGCTGATCTCAAGCC | ACGTTGGATGCCAAGAGTGGACAGACTTAC | 45.5 |
| W2 | 7039068 | ACGTTGGATGGAAGAGAATTCATTCACGGC | ACGTTGGATGCTTCCCAAGGCTCTGGCAAA | 51.6 |
| W2 | 1065464 | ACGTTGGATGTGGCCTGACTTCTGCTGGT | ACGTTGGATGCAGGATCACCTGCTCTGGA | 48.2 |
| W2 | 3746736 | ACGTTGGATGGACGGGAGTGAGATATATAG | ACGTTGGATGTGTCATTCTCTTGCATT | 50.3 |
| W2 | 823172 | ACGTTGGATGGAGGCAAATGGGTGGAAGTG | ACGTTGGATGAGGCTCCGGAGAACAGAGAT | 53.6 |
| W2 | 3749598 | ACGTTGGATGGATGGTAATGTAAGTGAACCC | ACGTTGGATGCATATGTCTCTCCAGATGGC | 52.3 |
| W2 | 2124489 | ACGTTGGATGAGCTGTAATGAGTCTTTCCC | ACGTTGGATGGGCTACTCACAATGTAGAGA | 46.2 |
| W2 | 7682031 | ACGTTGGATGGAAGAGAGGTCTGACTCAAG | ACGTTGGATGGATTCTCTGAGTGTCTTG | 45.3 |
| W2 | 6063377 | ACGTTGGATGACCAAGGGCTCCATGATGAC | ACGTTGGATGAACTACCAACACAAGCAAG | 49.2 |
| W2 | 1042364 | ACGTTGGATGAATTAACAGGCAGGTTTCC | ACGTTGGATGCCTCATCTTTGAAGATGCC | 46.2 |
| W2 | 12981996 | ACGTTGGATGATGTTGTTGTAGCTGGG | ACGTTGGATGCCAGAAACACCTGACAAAAG | 52.7 |
| W2 | 678892 | ACGTTGGATGGCCATGGATGAGAACCATAA | ACGTTGGATGCCAGTGGACTCTGGTTCAAT | 45.4 |
| W2 | 162036 | ACGTTGGATGTAAGAGAGACTGCGTCC | ACGTTGGATGCACAGCATCAGGGCTGTTAC | 46.8 |
| W2 | 12435621 | ACGTTGGATGCCATGGTAAACACTTCCCAA | ACGTTGGATGAACCACAGAGCTTTTCTCCC | 51 |
| W2 | 6767658 | ACGTTGGATGTTCTTCAACTGCTCTTTGGG | ACGTTGGATGTGCATGAACGTCCCAGAGAT | 47.1 |
| W2 | 12453150 | ACGTTGGATGTTAAATCTGGAGCAGTGCC | ACGTTGGATGAAGAAGTGGAGCTGCAAAAG | 56.8 |
| W2 | 4646491 | ACGTTGGATGGTGGTATCTCCTGTTTCTC | ACGTTGGATGATCTCGCGGACCTCCTCTC | 59.4 |
| W2 | 11636318 | ACGTTGGATGACGCCCCAGATACTATGTC | ACGTTGGATGCTTTCTGGCCAGACATTTAG | 52.9 |

Farmacogenómica del AZA
Anexos

| | | | | |
|----|----------|--------------------------------|--------------------------------|------|
| W2 | 11588069 | ACGTTGGATGCTCTGTGTTCTGAAGGTGC | ACGTTGGATGCAAGCCTACCACAATCATCG | 55.8 |
| W2 | 2820289 | ACGTTGGATGCATGGTTCTACAGAGACTGC | ACGTTGGATGTTACTCGGTGACATCAGTGC | 60.5 |
| W2 | 1537232 | ACGTTGGATGGTCACTCTGCCTCATATTG | ACGTTGGATGCTTTTAATAAAGGGTGTATC | 56.6 |
| W3 | 17007988 | ACGTTGGATGACCAGTACTGTCCAGGTC | ACGTTGGATGCCAAGATCATGGCAGACATC | 50.1 |
| W3 | 6841334 | ACGTTGGATGTAGTAGTCCCTGCGTGTGCT | ACGTTGGATGCTAGGGAAGAAAGTGGTGTG | 56.4 |
| W3 | 11723381 | ACGTTGGATGGGCAGAATTCTAGACGCAAC | ACGTTGGATGTCAGACCACGGTGGCCAG | 46.2 |
| W3 | 13157270 | ACGTTGGATGTTCTAAGAGACCAACAGC | ACGTTGGATGAATCCTTGTGCAAGTTCCCG | 46.4 |
| W3 | 2297809 | ACGTTGGATGCTTATCTGACCATGTGCATC | ACGTTGGATGTTGCTGAGCTGGCGGTACAC | 47.4 |
| W3 | 12183109 | ACGTTGGATGAACCCTGGTGTCCCAAATTC | ACGTTGGATGAAACAGTGACGACTTCCGAG | 47.4 |
| W3 | 3729961 | ACGTTGGATGAACTGACAGTAAATCTCAC | ACGTTGGATGGCTGCATCTGATTTGCCAAC | 46.5 |
| W3 | 7681953 | ACGTTGGATGTGTCAGAACCGAAGATGATG | ACGTTGGATGGAAGCTGGTGGATAATGCTC | 46.4 |
| W3 | 1338314 | ACGTTGGATGAGTATTGAGCCCAAGGTCG | ACGTTGGATGTTGTTGAGGGTGTGAATGG | 51.8 |
| W3 | 3810651 | ACGTTGGATGTCGACACGGTTGCGGATTC | ACGTTGGATGCACAGCTATGGTGTTCGCTT | 45.3 |
| W3 | 17021270 | ACGTTGGATGCAGAAGGAGTGATCCAGTTG | ACGTTGGATGTGTGCACGTCAGGAAGATTG | 49.4 |
| W3 | 17782413 | ACGTTGGATGTCTAATGGAATGGACCAATC | ACGTTGGATGCTTCTCTATCTTGAAGTGGG | 49.9 |
| W3 | 441827 | ACGTTGGATGCATTTGGACCGCCTTTTTCG | ACGTTGGATGCCAATCCTTGTGGTCTTGG | 46.9 |
| W3 | 1637215 | ACGTTGGATGGAGACAGGTGGGTATATATC | ACGTTGGATGGTTTTGCGACTGAAGAACAC | 48.1 |
| W3 | 3812909 | ACGTTGGATGAATTCTTCTATGCCAAG | ACGTTGGATGTTATTGTAGGAGTCATACT | 48.7 |
| W3 | 11919970 | ACGTTGGATGAGTTGGGTTGCCACAGTTC | ACGTTGGATGCTCCAGTTGGGGAATATCAG | 45.9 |
| W3 | 9464 | ACGTTGGATGACGCCATGTTACCTGTTTC | ACGTTGGATGCTTCCAGAACGGGAGAGAC | 47.1 |
| W3 | 4792311 | ACGTTGGATGCTATTACCATGTGGAAGGTG | ACGTTGGATGCAGTCCAGAGCGATCTTCA | 47.3 |
| W4 | 1053019 | ACGTTGGATGAGTTCTCTGCCCAGAGTG | ACGTTGGATGGTGTCTCAGAAGCCTTTCGG | 48 |
| W4 | 2297980 | ACGTTGGATGTACTACAGAAATCTGGATGG | ACGTTGGATGTGAAATAAGCCTCTAGGTCC | 45 |
| W4 | 6516605 | ACGTTGGATGAAGCGTCAGCCATTCTCAAC | ACGTTGGATGATCCACCTCCTCCCGCAA | 47.4 |