

ARTÍCULO ORIGINAL

Desarrollo de un protocolo de pirosecuenciación para la tipificación del polimorfismo -31 del gen de la interleucina-1 β en el estudio del riesgo al desarrollo de cáncer gástrico

Dr. Guillermo Ignacio Pérez-Pérez,* Dra. Cynthia Portal-Celhay,* Dr. Francisco Javier Bosques-Padilla,** Dra. Elvira Garza-González***

* Departments of Medicine and Microbiology, New York University School of Medicine. ** Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". *** Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Correspondencia: Dra. Elvira Garza-González. Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México. Av. Madero y Dr. Aguirre s/n. Col. Mitras Centro. Monterrey, N. L. C.P. 64460. Tel.: (52)8329-4166. Fax: (52)8348-5477.

Correo electrónico: elvira_garza_gzz@yahoo.com

Recibido para publicación: 29 de agosto de 2006.

Aceptado para publicación: 14 de febrero de 2007.

RESUMEN **Antecedentes:** los estudios de asociación entre casos y controles en la búsqueda de polimorfismos de una sola base (SNPs) se han utilizado ampliamente en ensayos genéticos. El método de pirosecuenciación se basa en la cuantificación del pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de nucleótidos en un templado amplificado. Tiene las ventajas de su exactitud, flexibilidad, automatización y rapidez cuando se compara con el método de reacción en cadena de la polimerasa con el de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (PCR-RFLP). **Objetivo:** desarrollar un protocolo para la determinación del polimorfismo de la posición -31 del gen de la interleucina-1 β (IL-1 β) empleando la tecnología de pirosecuenciación. **Métodos:** se estudiaron 162 pacientes (F:M = 0.93) que fueron enrolados en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". De los pacientes estudiados, 123 (75.9%) presentaban dispepsia no ulcerosa y 39 (24.1%) tenían cáncer gástrico confirmado histológicamente. El polimorfismo en la posición -31 se determinó por el método de PCR-RFLP y por pirosecuenciación. Se emplearon las mismas secuencias de iniciadores para la PCR-RFLP y para la pirosecuenciación. Para la PCR-RFLP se empleó la endonucleasa de restricción Alu1 y para la pirosecuenciación se diseñó un iniciador de secuencia específico. **Resultados:** de las muestras estudiadas, 157 (96.9%) fueron claramente genotipificadas por el método de pirosecuenciación y los resultados fueron los mismos por el método de PCR-RFLP. En cinco (3.1%) muestras no se obtuvo el mismo resultado tanto por RFLP como por pirosecuenciación: dos de ellas fueron TT y dos fueron CT por el método de secuenciación y las cuatro fueron C/C por el método de PCR-RFLP. La muestra

SUMMARY **Background:** Single nucleotide polymorphism association studies among cases and controls have been widely used for genetic analysis. The pyrosequencing method is based on indirect luminometric quantification of the pyrophosphate that is released as a result of nucleotide incorporation onto an amplified template. It has the advantages of accuracy, flexibility, automation and speed when compared with PCR-RFLP method. **Aim:** To develop a protocol for allele frequency determination using pyrosequencing technology in the detection of the polymorphism at position -31 of the interleukin-1 β (IL-1 β) gene. **Methods:** 162 patients (F/M = 0.93) who were enrolled at the Hospital Universitario Dr "José Eleuterio Gonzalez" were studied. 123 patients had non-ulcer dyspepsia and 39 had histologically confirmed gastric cancer (GC). The polymorphism of IL-1 β -31 was determined by both RFLP and pyrosequencing methods. PCR-RFLP method used Alu1 restriction endonuclease. The same specific primers for PCR-RFLP and pyrosequencing were used for initial amplification and an additional biotinylated specific primer was designed for sequencing. **Results:** 157 (96.9%) samples were clearly typed by the pyrosequencing method and the results were in accordance with the results of the PCR-RFLP method. The results of 5 samples (3.1%) were not in accordance between both methods. Two of them were T/T and 2 were C/T by sequencing method and all four were C/C by RFLP. Another sample was C/C by sequencing and T/T by RFLP. **Conclusion:** The pyrosequencing method is not only suitable for the IL-1 β -31 genotyping but is a fast and unexpensive way of genotyping since requires smaller amounts of DNA, and required significantly less time in the generation of re-

restante fue C/C por el método de secuenciación y T/T por el método de RFLP. **Conclusión:** la pirosecuenciación es una técnica adecuada para la genotipificación del gen IL-1 β , ya que es rápido y económico en consideración de la cantidad de ADN empleada y los reactivos necesarios para la obtención de resultados. El protocolo desarrollado es útil para la tipificación del polimorfismo -31 de la IL-1 β .

Palabras clave: citocinas, pirosecuenciación, secuenciación, Helicobacter pylori, cáncer gástrico, interleucina-1 β .

ANTECEDENTES

Los estudios entre casos y controles son ampliamente utilizados en la búsqueda de marcadores genéticos para diferentes enfermedades. Un gran número de individuos debe ser investigado para definir una asociación, lo cual resulta laborioso y requiere de periodos de tiempo prolongados.

Entre los marcadores genéticos se han estudiado los polimorfismos de una sola base (SNPs), los cuales son el tipo más común de polimorfismo en el genoma humano, con una frecuencia aproximada de uno por cada kilobase.¹

Un buen ejemplo de los SNPs es un polimorfismo bialélico en la posición -31 en el promotor del gen de la IL-1 β , el cual ha sido asociado con el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes caucásicos, asiáticos, portugueses y mexicanos.²⁻⁶ Esta asociación se ha explicado principalmente porque la IL-1 β es un potente inhibidor de la secreción de ácido en el estómago, lo cual promueve el desarrollo de condiciones preneoplásicas y/o cáncer gástrico.² Una de las razones por las que es importante determinar el papel de estos polimorfismos en cáncer gástrico es porque se ha reportado que la incidencia de cáncer gástrico en México va en aumento.⁷

Actualmente existen varios métodos disponibles para la genotipificación de SNPs: métodos basados en las propiedades fisicoquímicas de los alelos, métodos basados en la hibridación, amplificación o ligación de una sonda alelo específica y métodos basados en la secuenciación o minisecuenciación de un iniciador adyacente al sitio del SNP, tal como el método de pirosecuenciación.⁸

La secuenciación del ADN ha sido la técnica más exacta y que ha proporcionado mayor información a pesar de su empleo limitado en diagnóstico. La limitación se ha debido principalmente a la complejidad del empleo de estas técnicas.⁹⁻¹³ La pirosecuenciación es una técnica

que no requiere de la elaboración de un gel y que se basa en la incorporación interactiva de nucleótidos específicos durante la extensión por una polimerasa guiada por un iniciador de secuenciación.^{9,10} Empleando una mezcla de cuatro enzimas, el método se basa en la detección luminométrica de pirofósforato que es liberado una vez que se incorpora un nucleótido, con señales de luz proporcionales al número de nucleótidos incorporados.⁹⁻¹³

En el caso de la técnica de PCR-RFLP, como en el caso de la pirosecuenciación se requiere una reacción de PCR. Sin embargo, vez obtenido y visualizado el producto de PCR éste debe de ser digerido con una enzima de restricción que específicamente ataca el sitio donde está el SNP. La digestión da como resultado productos de diferente tamaño dependiendo del genotipo del paciente y éstos tienen que ser visualizados en un gel de agarosa, lo cual no es siempre sencillo.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la determinación del polimorfismo de la posición -31 del gen de la interleucina-1 β empleando la tecnología de pirosecuenciación por comparación de los resultados obtenidos con esta tecnología con los resultados obtenidos con la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (PCR-RFLP).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la determinación del polimorfismo de la posición -31 del gen de la interleucina-1 β empleando la tecnología de pirosecuenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Ciento sesenta y dos pacientes (F/M = 0.93, 18-92 años) fueron invitados a participar en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". De los pacien-

tes incluidos, 123 tenían dispepsia no ulcerosa y 39 tenían cáncer gástrico demostrado histológicamente.

Extracción del ADN genómico humano

El ADN genómico humano se extrajo de 250 μ L de sangre completa, la cual se suspendió en amortiguador de lisis (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], EDTA 5 mM, dodecil sulfato de sodio [SDS] 0.2%, NaCl 200 mM). El ADN se extrajo dos veces en un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó con etanol al 100% y se lavó dos veces con etanol al 70%. El ADN se dejó secar al aire y se resuspendió en 200 μ L de amortiguador Tris-EDTA.

Detección del polimorfismo en la posición -31 del gen *IL-1 β* por la técnica de PCR-RFLP

Para la PCR se emplearon los iniciadores: F: 5'-CCAC-CAATACTTTTCCCCTTCC-3' y R: 5'-GATT-GGCTGAAGAGAATCCCAGAGC-3'. Se prepararon mezclas de reacción con una concentración 25 pmolar de cada iniciador, 100 ng de ADN genómico, cada desoxinucleósido trifosfato (Qiagen, Santa Clarita, CA) a una concentración de 100 μ M, y 1 U de *Taq* ADN polimera (Promega Madison, WI). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automatizado (Perkin-Elmer Corporation, Wellesley, MA) con 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, seguido de 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Alu*I (New England Biolabs) y los fragmentos de ADN obtenidos resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Las imágenes de los geles fueron capturadas empleando el equipo Eagle eye II Still Video System (Stratagene, La Jolla, CA).

Producción de los productos de PCR por pirosecuenciación

Los productos amplificados del análisis de PCR-RFLP se emplearon como ADN blanco para una segunda amplificación con el iniciador F empleado previamente y el iniciador R biotinilado con las condiciones de PCR descritas para el método de PCR-RFLP.

Pirosecuenciación

Para la pirosecuenciación,^{9,10} los productos de PCR biotinilados (25 μ L) se inmovilizaron en una suspensión

de perlas de sefarosa cubiertas con estreptavidina en amortiguador de unión. Las muestras se incubaron por 5 min en agitación constante a 1,400 rpm y después de la inmovilización, los complejos perlas-templados se sumergieron en amortiguador de lavado (AL) y de la NaOH 0.5 M. Las muestras se lavaron en AL y las perlas se añadieron a 45 μ L de amortiguador de apareamiento que contenía el iniciador de secuenciación diseñado especialmente para este experimento en una concentración 15 pmol, (5'- TCCTACTTCTGCTTTT-GA-3'). El apareamiento se llevó a cabo a 80 °C por 2 min y los templados se dejaron a temperatura ambiente mientras se preparó la mezcla de reacción para la secuenciación.

Se llevó a cabo la transferencia de los complejos perlas-templados empleando el dispositivo a PSQ 96 *Sample Prep Station* (Pyrosequencing AB). La pirosecuenciación de tiempo real se llevó a cabo en el pirosecuenciador PSQ SNP 96 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden).

RESULTADOS

Identificación de las posiciones polimórficas

La genotipificación por el método de PCR-RFLP se llevó a cabo y los genotipos fueron claramente identificados.

La genotipificación del polimorfismo en *IL-1 β -31* se llevó a cabo también por pirosecuenciación y por este método los genotipos fueron claramente identificados con los pirogramas obtenidos (*Figura 1*).

Los resultados de tipificación de PCR-RFLP y pirosecuenciación fueron registrados y tabulados (*Cuadro 1*) (Kappa = 0.9953). Entre todas las muestras tipificadas, 157 (96.9%) tuvieron el mismo resultado por el método de pirosecuenciación y por el método de PCR-RFLP.

En cinco (3.1%) muestras no se obtuvieron los mismos resultados por los dos métodos. Dos de ellas fueron T/T y dos fueron C/T por el método de pirosecuenciación. Las cuatro muestras fueron C/C por el método de PCR-RFLP. Una muestra más fue C/C por el método de secuenciación y se tipificó como T/T por el método de PCR-RFLP.

DISCUSIÓN

El polimorfismo bialélico en la posición -31 del gen *IL-1 β* ha sido asociado al desarrollo de cáncer gástrico en poblaciones asiáticas, caucásicas, portuguesas y en población mexicana.³⁻⁶ La consistencia en esta asociación

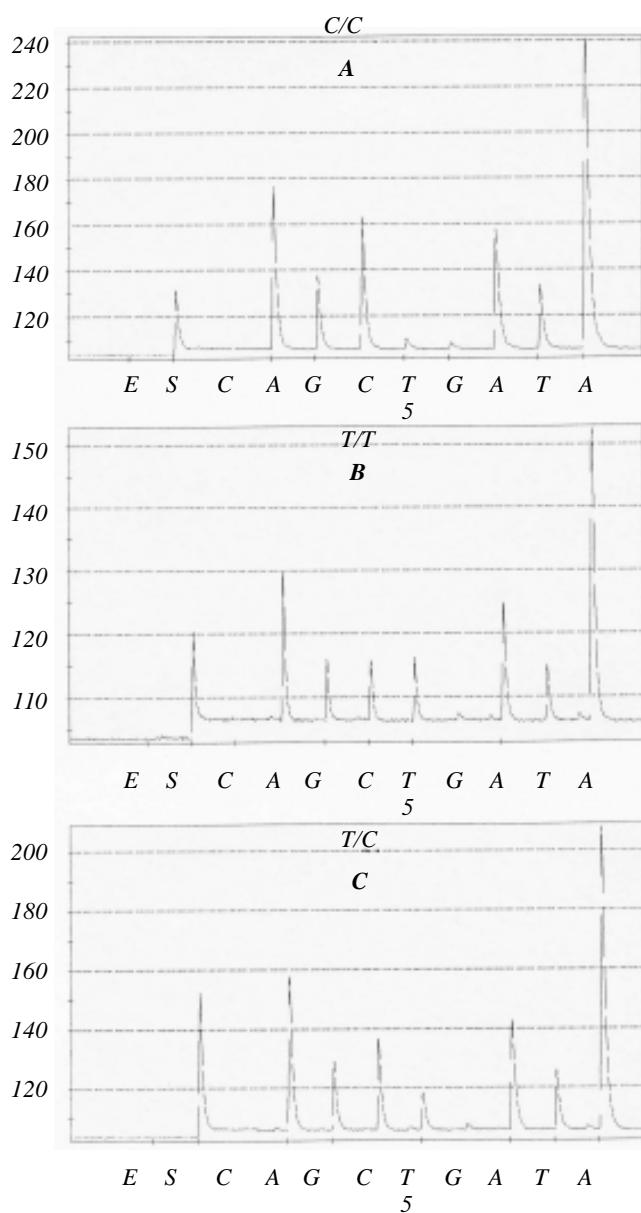


Figura 1. Ejemplo de algunos pirogramas obtenidos: A) genotipo CC, B) genotipo TT y C) genotipo TC.

ha hecho evidente que este polimorfismo representa una importante oportunidad de identificar individuos en riesgo al desarrollo de cáncer gástrico.

El desarrollo de métodos rápidos, accesibles y con capacidad de tipificar una gran cantidad de individuos es conveniente no sólo para la detección de este polimorfismo, sino también para la identificación de otros marcadores genéticos en estudios de casos y controles.

Las técnicas tradicionales de la biología molecular son laboriosas, requieren un tiempo prolongado de proceso y además presentan algunas dificultades en la interpretación de resultados. Particularmente la PCR-RFLP requiere de preparación de mezclas de reacción para una amplificación inicial seguida de la preparación de mezclas para la digestión con endonucleasas de restricción y corrimiento en gel de agarosa. La manipulación excesiva y la necesidad de visualización de productos amplificados y productos de digestión en geles de agarosa son una explicación potencial para la discordancia observada en cinco (3.1%) muestras.

La técnica de pirosecuenciación es automatizada luego de la obtención de un producto amplificado y la detección de la señal de luz se realiza mediante un instrumento que elimina el inconveniente de la detección óptica humana.¹ Ofrece, además, importantes ventajas tales como la rapidez y un bajo costo, y si bien es necesario la inversión inicial en la compra de un equipo, el bajo consumo de reactivos y la versatilidad del equipo permiten amortiguar a corto plazo la inversión inicial. Si tomamos en cuenta que el costo de una prueba de RFLP sería de alrededor de 20 dólares tomando en cuenta tiempo y reactivos, mientras que una prueba de pirosecuenciación sería de alrededor de cinco dólares, el precio del equipo de pirosecuenciación que es de cerca de 50,000 dólares podría amortiguar en poco tiempo si se toma en cuenta la automatización de la prueba con la consecuente reducción en el número

CUADRO 1

RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN DEL
POLIMORFISMO IL-1 β -31 POR LOS MÉTODOS DE PIROSECUENCIACIÓN Y POR EL MÉTODO DE PCR-RFLP

Genotipo encontrados por RFLP y pirosecuenciación (n = 157)	Genotipo encontrados por RFLP (n = 5)	Genotipo encontrados por pirosecuenciación (n = 5)
C/C	57 (36.3)	4 (80)
C/T	77 (49)	0 (0)
T/T	23 (14.6)	1 (20) ¹
		2 (40) ²
		2 (40) ²

¹ Tipificado como TT por PCR-RFLP. ² Tipificado como C/C por el método de PCR-RFLP.

de repeticiones y su posible uso en otro tipo de análisis de SNPs.

Entre los métodos empleados para la detección de polimorfismos genéticos, se han empleado diversas técnicas, entre ellas, la secuenciación ha sido utilizada como estándar de oro. Esta técnica generalmente se realiza en productos de más de 100 pares de bases, lo cual hace que este técnica sea costosa y complicada en su proceso. Por el contrario, en el método de pirosecuenciación se pueden secuenciar productos de aproximadamente 10 pares de bases entre las cuales se encuentra el polimorfismo de interés, lo cual disminuye sustancialmente los costos, simplifica el proceso y hace esta técnica de gran utilidad en el análisis de un gran número de muestras, tal como en los estudios de asociación de casos y controles.⁹⁻¹¹

En este trabajo se desarrolló un método para la detección del polimorfismo -31 del gen *IL-1 β* y los resultados muestran que este método podrá ser utilizado con seguridad en la tipificación de este gen y otros genes para los cuales los métodos pueden ser desarrollados.

Se ha demostrado en diversas poblaciones del mundo, incluyendo la población mexicana, que existen factores genéticos que definen un mayor riesgo al desarrollo de cáncer gástrico.^{2-6,8}

El desarrollo de métodos que faciliten el análisis de estos marcadores moleculares con aplicación de tecnología de vanguardia, y con molestias mínimas para los pacientes en la obtención de las muestras será de gran utilidad para estudiar y conocer mejor las características genéticas de la población, no sólo en el estudio del

cáncer gástrico, sino de muchas otras enfermedades estudiadas por la gastroenterología y la hepatología.

REFERENCIAS

1. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 2000; 280: 103-10.
2. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.
3. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease. *Gut* 2001; 48: 743-7.
4. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, et al. Effect of genetic polymorphism in interleukin-1 β on gastritis, gastric juice pH, and recurrence of peptic ulcer disease in Japanese subjects. *Gastroenterology* 2002; 123: 92-106.
5. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, et al. Role of the polymorphic IL-1 β , IL-1RN and TNF- α genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 2005; 20; 114: 237-41.
6. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, et al. Interleukin 1 β and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 823-9.
7. Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. Trends in Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1874-7.
8. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi MP. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2002; 19: 479-85.
9. McNeely T. Pyrosequencing AB. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 217-21.
10. Neve B, Froguel P, Corset L, Vaillant E, Vatin V, Boutin P. Rapid SNP allele frequency determination in genomic DNA pools by pyrosequencing. *Biotechniques* 2002; 32: 1138-42.
11. O'Meara D, Wilbe K, Leitner T, Hejdeman B, Albert J, Lundeberg J. Monitoring resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2464-73.
12. Ronaghi M. Pyrosequencing for SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2003; 212: 189-95.
13. Wasson J, Skolnick G, Love-Gregory L, Permutt MA. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology. *Biotechniques* 2002; 32: 1144-6.