

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA



Perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en
pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital
Regional de Ayacucho - 2013.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:
Bach. **VERA MEZA, MARLENY**

AYACUCHO – PERÚ
2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bachiller: Vera Meza Marleny

R.D.N° 089-2014-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho a horas 4 de la tarde, del día 15 de agosto del 2014, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos los miembros del jurado evaluador, presidido por el Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista por encargo del Sr. Decano de la Facultad mediante memorando 338-20-FCB-D y conformado por los profesores Mg Paula García Godos Alcázar; Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Mg Hugo Roberto Luna Molero y como secretario docente el Blgo. Elbert Hermoza Valdivia, con la finalidad de recepcionar en acto público la sustentación de tesis: Perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho 2013, presentado por la bachiller en Farmacia y Bioquímica Marleny Vera Meza con el que pretende obtener el título profesional de Químico Farmacéutica.

El Mg. Martín Tenorio Bautista encargado de la presidencia del jurado después de haberse dado lectura a los antecedentes para dicho acto, invita a la sustentante para que exponga su trabajo en el tiempo de reglamento que no debe ser mayor a 45 minutos. De inmediato la sustentante cumple con iniciar el proceso de sustentación.

Concluida la exposición del trabajo de tesis el presidente (e) invita a los profesores que efectúen sus preguntas y puedan a su vez solicitar aclaraciones que crean por conveniente, a las preguntas efectuadas la sustentante da respuesta que son tomadas en cuenta para la calificación. Concluida la exposición y respuestas a preguntas, el presidente (e) invita al público asistente y sustentante hagan abandono del auditorio para deliberar y calificar la sustentación con la que queda de la siguiente forma:

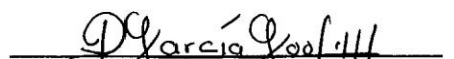
Miembro jurado	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Mg. Saturnino M. Tenorio B.	18	18	18
Mg. Paula García Godos A.	19	18	19
Blgo. Tomás Yuret Miranda T.	19	20	20
Mg. Hugo R. Luna Molero	17	17	17
		Promedio	19

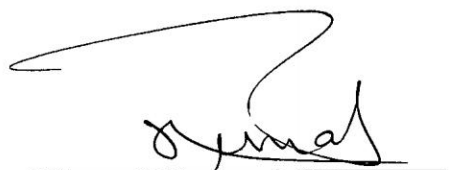
De la calificación efectuada se obtiene la nota promedio de diecinueve (19) Aprobatorio.

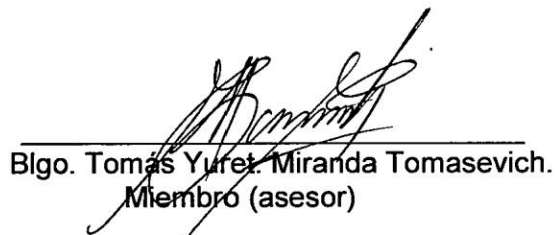
A continuación se invita a la sustentante y público que ingrese al auditorio con la finalidad de conocer el resultado obtenido para la sustentante y se le toma el juramento de ley.


El acto de sustentación culmina siendo las 6:10 de la tarde, firmando al pie del presente los miembros dando fe al acto.


Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista.
Presidente (e) Miembro


Mg. Paula García Godos Alcázar.
Miembro


Mg. Hugo Roberto Luna Molero
Miembro


Blgo. Tomás Yurek Miranda Tomasevich.
Miembro (asesor)


Blgo. Elbert Hermoza Valdivia.
Secretario docente

DEDICATORIA

A Dios por el día a día. A mis padres, por su amor incondicional y complicidad en cada etapa de mi vida, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater* forjadora de profesionales competentes al servicio de la sociedad en general.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de formación Profesional de Farmacia Y Bioquímica, a las aulas universitarias por acogerme durante estos 5 años universitarios, a los laboratorios del centro de investigación en Biología Molecular y Bioinformática por el gran apoyo brindado para la realización y culminación de mi formación profesional.

Al Hospital Regional de Ayacucho Miguel Ángel Mariscal Llerena, por el apoyo y facilidades brindada durante el desarrollo y ejecución del presente trabajo de investigación.

A mis profesores que con empeño supieron desempeñarse e impartir sus conocimientos, contribuyendo en mi formación profesional en el transcurso de la vida universitaria y prepararme para los retos que pone la vida.

A mis asesores, Blgo. Tomas Yuret MIRANDA TOMASEVICH Y Dr. Jhony Aldo TINCO JAYO, quienes influyeron con sus lecciones y experiencias para mi desenvolvimiento en la realización y culminación del presente informe.

Gracias a las personas importantes en mi vida, mis padres Victoria y Máximo, por cada palabra de aliento y presentes en cada decisión, a mis hermanos por tanto cariño, comprensión y apoyo de siempre. Y a mis amigos por acompañarme y estar siempre listos para brindarme su apoyo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Tuberculosis (TBC)	5
2.3. Gen <i>CYP2D6</i>	7
2.4. La reacción en cadena de la polimerasa PCR	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	19
3.2. Definición de población y muestra	19
3.2.1 Población	19
3.2.2 Muestra	19
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	19
3.4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
3.4.1. Estandarización de XL-PCR para la amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> .	22
3.4.2. Estandarización de PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> .	22
3.4.3. Estandarización de PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*3</i> .	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	38
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad enzimática de los diferentes alelos del CYP2D6	9
Tabla 2. Detección del Gen CYP2D6, alelos: CYP2D6*1, CYP2D6*4, CYP2D6*6 y CYP2D6*3, y genotipos; mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho – 2013.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Productos de la amplificación de fragmento de 2 900 pb del gen <i>CYP2D6</i> mediante XL-PCR con 1, 2 y 3 "punch" de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA, en gel de agarosa al 1,5 %.	26
Figura 2. Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de cinco pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.	27
Figura 3. Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de nueve pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.	28
Figura 4. Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de seis pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.	29
Figura 5. Productos de amplificación de PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> , con diferentes volúmenes del producto XL – PCR (amplificón) como ADN molde, en gel de agarosa al 3 %.	30
Figura 6. Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de siete pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> , en agarosa al 3 %.	31
Figura 7. Figura 7: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de siete pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> , en gel de agarosa al 3 %.	32
Figura 8. Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de seis pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> , en gel de agarosa al 3 %.	33
Figura 9. Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de tres pacientes (duplicado), mediante PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> , en gel de agarosa al 3 %.	34

- Figura 10. Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %. 35
- Figura 11. Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %. 36
- Figura 12. Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de seis pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %. 37

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Flujograma para la detección del Gen <i>CYP2D6</i> , alelos: <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*6</i> y <i>CYP2D6*3</i> , y genotipos; mediante las técnicas variantes de PCR.	50
Anexo 2. Extracción del ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	51
Anexo 3. Carta de consentimiento informado individualizado	52
Anexo 4. Detección del Gen <i>CYP2D6</i> y alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*6</i> y <i>CYP2D6*3</i> , mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho – 2013.	55
Anexo 5. Fotografías:	56
Reactivos para extracción de ADN en Tarjetas FTA	56
Cabina pre-PCR, preparación del “mix” para XL – PCR.	56
Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA	57
Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA	57
Coloración del gel de agarosa conteniendo los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjeta FTA, con bromuro de etidio al 1 %.	58
Sistema de registrador de imágenes Biometra <i>UV solo TS</i> del gel de agarosa con los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjeta FTA, con bromuro de etidio al 1,5 %.	58
Anexo 6. Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del “ladder 1 kb”	59
Anexo 7. Estandarización para la amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL- PCR con 1, 2 y 3 punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	60
Anexo 8. Condiciones para la amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL- PCR con 3 punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	61
Anexo 9. Estandarización de PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> con volúmenes de 5µL y 10µL del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde.	62
Anexo 10. Condiciones de PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> con 10µL del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde.	63
Anexo 11. Estandarización de PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*3</i> con punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	64
Anexo 12. Matriz de consistencia	65

RESUMEN

El citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo humano; participa en la oxidación de más del 20% de las drogas de uso clínico, se expresa de forma muy variable, dependiendo del grupo étnico.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre de 2013 a Junio de 2014 en la ciudad de Ayacucho - Perú. Planteándonos como objetivos: determinar el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho; estandarizar las técnicas de XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer; y detectar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de estos pacientes.

La muestra estuvo conformada por 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, que voluntariamente aceptaron participar en el presente estudio firmando la carta de consentimiento informado, el material biológico fue sangre capilar impregnada en tarjetas FTA.

Se determinaron las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para amplificar un fragmento del gen *CYP2D6*; contenido del "mix" para un volumen final de 50 µL: buffer 1X, MgSO₄ 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,5 µM, primer Rv 0,5 µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,5 U, ADN molde tres "punch"; programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 65,0 °C por 45 s y 70 °C por 2 min, seguidos por 10 min a 70 °C para la extensión final.

Se determinaron las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa PCR anidado, para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*; contenido del "mix" para un volumen final de 50 µL: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2mM, primer Fw 0,5 µM, primer Rv 0,5 µM y Taq ADN polimerasa 1 U, el ADN molde (amplicón del XL-PCR) 10 µL; programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 10 s y 72°C por 1 min, seguidos por 5 min a 70 °C para la extensión final.

Se determinaron las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*3*; el "mix" para una reacción con un volumen final de 25 µL, conteniendo: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 Mm desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,4 mM, primer *CYP2D6*3-3* 0,12µM, primer *CYP2D6*3-4 new* 0,12µM, primer *CYP2D6*3-6* 0,3 µM, primer *CYP2D6*3-awf* 0,3 µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,25 U, tres punches conteniendo ADN de sangre capilar, para cada tubo. La programación fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 63°C por 30 s y 72 °C por 1 min, y luego 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 53°C por 30 s 72 °C por 1 min.

En conclusión: El perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, corresponde a 17 pacientes con genes heterocigotos, dentro de las tres posibilidades: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6; y tres pacientes con genes heterocigotos *1/*3. Las variantes alélicas detectadas en 17 pacientes corresponde a: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 y tres pacientes con *1/*3; es decir todos presentan genotipos heterocigotos, por tanto todos tienen al menos un alelo *1 que es el silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal.

Palabra clave: gen *CYP2D6*, XL-PCR *CYP2D6*, farmacogenética *CYP2D6*.

I. INTRODUCCIÓN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis*, es la segunda causa de mortalidad por un agente infeccioso en el mundo, luego del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), determinando 1,8 millones de muertes por año. Noventa y ocho por ciento de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo como Perú.¹ El tratamiento se basa en diversos regímenes de terapia combinada (varios medicamentos) de corta duración formulados en los decenios de 1970 y 1980, y que han ido mejorando en el transcurso de los años, teniendo en cuenta tres propiedades fundamentales de los medicamentos antituberculosos: capacidad bactericida, capacidad esterilizante y capacidad de prevenir la resistencia. La isoniazida y la rifampicina son considerados como el núcleo básico del tratamiento antituberculoso, a la que se agregó posteriormente la pirazinamida; todas ellas pueden eliminar el bacilo de la TB (*Mycobacterium tuberculosis*) en cualquier localización, a nivel intracelular y extracelular.² El citocromo P450 2D6 (CYP2D6), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo. Participa en la oxidación de más de un 20% de las drogas de uso clínico, se expresa en el hígado, en el intestino y en el cerebro de forma muy variable.³ La actividad del CYP2D6 es extremadamente variable debido a la existencia de un gran número de variantes alélicas que definen cuatro niveles principales de actividad (fenotipos):

metabolizadores ultrarrápidos (MUR), presentan actividad aumentada, metabolizadores rápidos (MR) individuos que tienen actividad normal, metabolizadores intermedios (MI) con actividad disminuida susceptibles a la inhibición por otros medicamentos, y metabolizadores lentos (ML), que son los individuos con actividad pobre o ausente del gen.⁴ El Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, cuenta con el proyecto de investigación regional: Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9* y *CYP2C19* en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú, y considerando que esta población es vulnerable a muchas enfermedades infecciosas como la tuberculosis, atribuibles a la pobreza, acceso limitado a servicios de salud y alta prevalencia de infección por VIH, formulamos el presente trabajo como parte del citado estudio, que se desarrolló durante los meses de octubre de 2013 a Junio de 2014 en la ciudad de Ayacucho. Planteándonos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar las técnicas de XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer, para amplificar el gen *CYP2D6*, a partir de muestras de sangre capilar impregnadas en tarjetas FTA.
- Detectar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de los pacientes en estudio.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En los últimos años, la tuberculosis (TBC) ha sido considerada un problema de salud pública reemergente.^{5, 6} El control de tuberculosis en el Perú tiene varias décadas de ejercicio, con resultados variables. En los últimos 15 años han ocurrido cambios importantes en el control eficiente de la tuberculosis (TB) en condiciones de trabajo real. Las tasas de morbilidad e incidencia anual de TB tendieron a disminuir (tasa de morbilidad año 2004: 124,4 x 100 000 habitantes; tasa de incidencia anual de TB todas las formas 107,7 x 100 000 habitantes; tasa de incidencia de TB pulmonar frotis positivo (TBP-FP):66.4 x 100 000 habitantes). En total 43 276 personas con TB para el año 2004, de los cuales 18 289 casos nuevos de TBP-FP. Ello significó una disminución de 51,4% en la tasa global de TB, respecto al año 1992 (año de máxima tasa).² En el ser humano, las enzimas codificadas por los genes CYP450 se encuentran principalmente en el hígado, donde metabolizan fármacos, toxinas y otras sustancias extrañas que entran en el organismo. El CYP2D6 es uno de los isoenzimas mejor caracterizados de la familia CYP450.⁷

El descubrimiento de los polimorfismos de CYP2D6 se describe como un evento de serendipia (hallazgo afortunado e inesperado), cuando un individuo, al tomar una dosis de prueba de debrisoquina (un fármaco bloqueador adrenérgico usado

para el tratamiento de la hipertensión), sufrió un colapso con hipotensión vascular. Los estudios en este individuo demostraron que los efectos observados se debían a una metabolización lenta de la debrisoquina causada por un polimorfismo en el gen *CYP2D6* que producía una enzima defectuosa en la hidroxilación.⁸

Se han relacionado alrededor de 20 polimorfismos con el fenotipo MP, de los cuales aproximadamente el 95% corresponden a los alelos *3, *4, *5 y *6, en individuos caucásicos⁹, siendo el alelo con mayor frecuencia el *4, caracterizado por una sustitución de base G1934A en el sitio de *splicing* entre el intrón tres y el exón cuatro, produciendo un cambio en el marco de lectura resultando de esta mutación una proteína truncada. La variante *3 consiste en una delección de una base 2549A que también produce un cambio en el marco de lectura; el alelo *5 es causada por la delección completa del gen, y la variante *6 corresponde a una delección de una base T1707 en el exón tres, originando un cambio en el marco de lectura y la generación de un codón de parada después de la delección.⁹

Grimán, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centrooccidental de Venezuela, teniendo como resultado el alelo más frecuente *CYP2D6**4 con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas.¹⁰

Alanis, realizó estudios del polimorfismo gen *CYP2D6* en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango México, determinando las frecuencias de las variantes alélicas *CYP2D6**4 y *10.¹¹

Heras, Realizó estudios en pobladores sanos del Ecuador, acerca de la identificación del polimorfismo de un solo nucleótido en el gen *CYP2D6* del citocromo P450, comprobándose que la frecuencia de alelos *4 (8,5%) y *5 (2,2%) es similar a la reportada en estudios en población caucásica y mestizos

hispanos obteniendo como resultado la existencia de polimorfismos genéticos de *CYP2D6* en la población ecuatoriana.¹²

En México el estudio realizado por Bañuelos, sobre las frecuencias de las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en Menonitas, resultaron ser con mayor frecuencia los alelos *4 y *10, los cuales fueron similares a las reportadas en los caucásicos.¹³

En España estudios realizados por Rodríguez, sobre el papel del citocromo en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antidepresivos, resultó que el estudio de polimorfismo en los genes del citocromo P450 puede contribuir a una terapia individualizada en el tratamiento antihipertensivo.¹⁴

En Cuba los estudios desarrollados por Bárbaro, sobre estudio farmacogenético del polimorfismo metabólico de la debrisoquina (*CYP2D6*) en la población cubana en relación con la española, demuestran que se observan diferencias interétnicas en el polimorfismo genético del *CYP2D6* en la población cubana y en la frecuencia de metabolizadores ultrarrápidos respecto a los españoles.¹⁵

A nivel nacional, hasta la fecha, no se han reportado trabajos sobre estos temas, lo mismo que a nivel regional.

2.2 TBC

2.2.1 La tuberculosis

Es una enfermedad infecciosa, crónica, reemergente, cuyo principal agente etiológico es el *Mycobacterium tuberculosis*, que ataca a nivel de los pulmones (tuberculosis pulmonar) o también a nivel de otros órganos como riñones, colon, huesos, meninges, etc, (tuberculosis no pulmonar).²

Otro factor importante que contribuye a la resurgencia de la TBC es la emergencia de la resistencia a drogas antituberculosis. Un paciente presenta resistencia a drogas de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol o estreptomina). Aquellos pacientes que presentan resistencia al

menos a rifampicina e isoniacida a la vez (principales drogas del tratamiento antituberculoso), se les denomina pacientes multidrogorresistentes (MDR).²

Epidemiológicamente podemos clasificar la resistencia a drogas en dos categorías: resistencia primaria, cuando el paciente presenta resistencia, presumiblemente porque se ha infectado con una cepa resistente a drogas, ya que el paciente nunca antes ha recibido tratamiento antituberculoso; y resistencia secundaria o adquirida cuando el paciente inicialmente infectado con una cepa sensible a drogas desarrolla resistencia, ya que ha tenido tratamiento previo, probablemente ineficiente o intermitente.²

La historia natural del curso de la enfermedad tuberculosa muestra sugerentes indicios de variabilidad en las características del agente etiológico. Únicamente el 30% de las personas que son expuestas al patógeno muestran evidencia de infección tuberculosa, y alrededor de 10% de ellos desarrollan enfermedad tuberculosa. En aquellos que desarrollan la enfermedad, el periodo de incubación, la severidad y la distribución de la enfermedad es completamente variable. Sin embargo, antiguamente se creía que esa variabilidad sólo dependía del hospedero y de factores ambientales.¹⁶

Por otro lado la diseminación de cepas resistentes está atribuida a bajas tasas de detección de casos, demora en el diagnóstico e inicio del tratamiento.¹⁷

A pesar que la tuberculosis multidrogorresistente (TB MDR) es tratable con drogas de segunda línea el costo es enorme y en consecuencia no viable en países de bajos recursos.¹⁷

2.2.2 Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento se basa en diversos regímenes de terapia combinada (varios medicamentos) de corta duración formulados en los decenios de 1970 y 1980, y que han ido mejorando en el transcurso de los años, teniendo en cuenta tres propiedades fundamentales de los medicamentos antituberculosos: capacidad

bactericida, capacidad esterilizante y capacidad de prevenir la resistencia. La isoniazida y la rifampicina son considerados como el núcleo básico del tratamiento antituberculoso, a la que se agregó posteriormente la pirazinamida; todas ellas pueden eliminar el bacilo de la TB (*Mycobacterium tuberculosis*) en cualquier localización, a nivel intracelular y extracelular.²

El tratamiento farmacológico considera dos fases.²

- **Primera fase de inducción o bactericida:** de administración diaria, sirve para reducir rápidamente la población bacilar de crecimiento y multiplicación rápida y para prevenir la resistencia y con ello el fracaso.
- **Segunda fase de mantenimiento o esterilizante:** de administración intermitente. Incluye menor número de medicamentos, suficientes para conseguir la eliminación de los bacilos persistentes y evitar así las recaídas.

2.2.3 Medicamentos antituberculosis

- Medicamentos antituberculosis de primera línea, se utilizan en personas con tuberculosis en condición de: nuevos, recaídas y abandonos, son altamente eficaces y de buena tolerancia, entre ellos se encuentra: la rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomina (S).
- Medicamentos antituberculosis de segunda línea, se utilizan generalmente en personas con tuberculosis resistente a antibióticos, son menos eficaces y de menor tolerancia, excepto las quinolonas, entre ellos se encuentran la kanamicina (Kn), capreomicina (Cm), ethionamida (Eth), ciprofloxacino (Cx), moxifloxacino (Mx), cicloserina (Cs) ácido paraminosalicílico (Pas).²

2.3 Gen CYP2D6

El citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo. Participa en la

oxidación de más de un 20% de las drogas de uso clínico, se expresa en el hígado, en el intestino y en el cerebro de forma muy variable.¹⁸

EL gen *CYP2D6* se localiza en el cromosoma 22q13.1, presenta variabilidad interindividual en forma de variantes alélicas, se han descrito 50 alelos. Individuos con ciertos alelos presentaran actividad del gen que va de normal a disminuida o aumentada⁷; afectando la vía metabólica de la eliminación de las drogas, mostrando una falla en la respuesta terapéutica.⁴

El gen *CYP2D6* codifica para una enzima perteneciente al citocromo P450 que constituye una familia de hemoproteínas que juega un papel muy importante tanto en el metabolismo endógeno como exógeno.⁹

Las familias 1, 2 y 3 (*CYP1*, *CYP2* y *CYP3*, respectivamente) son particularmente activas en la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto (familias comprendidas desde la 4 hasta la 51) intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos, como esteroides, esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, etc.¹⁹

El *CYP2D6* es responsable del metabolismo mediante procesos de hidroxilación o de alquilación al menos de 20% de los medicamentos de importancia clínica, como antidepresivos y antipsicóticos, neurolépticos, algunos antiarrítmicos, bloqueadores β y opioides (analgésicos en el manejo del dolor moderado a severo). Se expresa en el hígado, en el intestino y en el cerebro de forma muy variable.⁸

Tabla 1: Actividad enzimática de los diferentes alelos del *CYP2D6*.⁶

Alelo	Actividad enzimática
<i>CYP2D6*1</i>	Actividad normal
<i>CYP2D6*2</i>	Actividad normal*
<i>CYP2D6*3</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*4</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*5</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*6</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*8</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*9</i>	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
<i>CYP2D6*10</i>	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
<i>CYP2D6*14</i>	Ausencia total de actividad metabólica
<i>CYP2D6*17</i>	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
<i>CYP2D6*35</i>	Aumento de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
<i>CYP2D6*41</i>	Disminución de la expresión génica

Las diferencias en la actividad de la enzima CYP450, independientemente de la causa (variaciones genéticas u otros factores ambientales, tales como alimentación, medicación concomitante, sexo, edad, estado de salud, hormonas, enfermedad hepática, inflamación, nutrición, embarazo, etc.), pueden afectar a la disponibilidad del fármaco en el organismo. En otras palabras, las diferencias en la actividad de la enzima CYP450 pueden ser responsables de si el fármaco alcanza los niveles sanguíneos terapéuticos deseados, así como de su perfil de aclaramiento del organismo. En consecuencia, los pacientes pueden experimentar diferencias notables con respecto a su respuesta a los fármacos, especialmente si el paciente recibe tratamiento simultáneo con muchos fármacos.¹⁵

2.3.1 Variabilidad genotípica y fenotípica

La actividad del Gen *CYP2D6* es extremadamente variable debido a la existencia de un gran número de variantes alélicas que definen cuatro niveles principales de actividad (fenotipos): metabolizadores ultrarrápidos (MUR), que son los individuos que presentan múltiples copias activas de *CYP2D6* y por lo tanto

presentan actividad aumentada, metabolizadores rápidos (MR) que son los individuos que tienen actividad normal o levemente reducida del gen, metabolizadores intermedios (MI) se asocia a la presencia de un alelo *CYP2D6* no funcional y a la de un alelo que codifica para una enzima con actividad disminuida son susceptibles a la inhibición por otros medicamentos, y metabolizadores lentos (ML), que son los individuos con actividad pobre o ausente del gen. Se considera que un individuo MUR tiene tres o más copias del gen activo *CYP2D6* por lo que muestra una actividad enzimática elevada.⁶ En los casos de ML y MR, por afectarse la vía metabólica de la eliminación de las drogas, se presentan casos adversos o falla en la respuesta terapéutica. Así mismo, esto puede explicar las diferencias interindividuales e interétnicas en la respuesta a los fármacos.⁴

2.4 Reacción en cadena de polimerasa

Desde 1983, numerosas investigaciones se han realizado en la optimización de PCR. Así, el primer avance importante fue el descubrimiento de Saiki²⁰ de las enzimas ADN polimerasa termo estable aislada de bacterias termófilas cuya actividad óptima se encuentra cercana a la temperatura de desnaturalización empleada durante el PCR. Inicialmente la enzima Taq ADN polimerasa, aislada de la bacteria *Thermusaquaticus*, fue la más usada. Otro gran avance fue el diseño de termocicladores automatizados que hacen a la técnica menos laboriosa.²⁰

Definición.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, más conocida como PCR por las siglas derivadas del inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica *in vitro* de amplificación exponencial enzimática de un segmento específico del ADN. Mediante la PCR se puede tener millones de copias de secuencias de ADN específicas. El proceso de amplificación es rápido, sensible y análogo al

fenómeno *in vivo* de la duplicación del ADN. En principio sólo se necesita una copia de la secuencia original (molde, diana, blanco) para obtener un resultado positivo.²⁰

Componentes:

a) El ADN molde (diana, blanco). Es el ADN del cual queremos copiar un fragmento e incrementar su concentración. El ADN de la muestra puede ser amplificado teóricamente a partir de una copia intacta del segmento de interés. Un gran número de copias del ADN molde aumenta la probabilidad de una amplificación del ADN. El ADN molde se puede obtener de organismos vivientes unicelulares o pluricelulares (microorganismos, animales, vegetales, etc.). Por ejemplo del humano se puede obtener de sangre, suero, orina, heces, esputo u otros fluidos.²⁰

Dependiendo del ADN a amplificar y el tipo de PCR a utilizar, las características de pureza y concentración varían. Es importante que el ADN esté libre de impurezas para que la actividad de la ADN polimerasa sea eficiente y la sensibilidad del ensayo no se vea disminuida. Así, las muestras biológicas obtenidas de humanos son sometidas a un procesamiento previo con la finalidad de eliminar o diluir posibles inhibidores de la reacción tales como: hemoglobina, heparina, detergentes, metales pesados, formalina, ácidos y agentes quelantes.²⁰

b) Iniciadores o cebadores. Los iniciadores son los oligonucleótidos pequeños de cadena simple que se diseñan de tal manera que sean complementarios a los extremos 3' y 5' de las hebras del segmento de ADN que se desea amplificar.²⁰

La longitud de cada uno de los cebadores debe estar comprendida entre 15 y 24 bases ya que se ha comprobado que cebadores de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los cebadores cortos carecen de suficiente

especificidad. La distancia entre los iniciadores es muy flexible puede ser desde 0,1 Kb hasta más de 10 Kb.²⁰

Se recomienda utilizar una concentración de oligonucleótidos iniciadores entre 0,1 a 0,5 μM . Concentraciones más elevadas de las indicadas pueden promover la formación de productos no específicos.²⁰

c) **ADN polimerasa.** La ADN polimerasa usada en PCR sintetiza ADN a partir de un oligonucleótido iniciador y una hebra de ADN molde. Su importancia radica en que son enzimas termoestables y termoactivas, es decir que soportan exposiciones repetitivas a altas temperaturas requeridas por la desnaturalización del ADN y que son activas a temperaturas a las cuales la hibridación de los iniciadores del ADN a amplificar ocurre con alta rigurosidad.²⁰

La primera enzima termoestable que fue utilizada para propósitos de amplificación fue la aislada de *Thermus aquaticus*, comúnmente denominada Taq ADN polimerasa. Posteriormente otras ADN polimerasas termoestables han sido generadas por ingeniería genética y presentan características adicionales tales como capacidad de corrección de errores y mayor tiempo de vida media. Ejemplo, la Pfu polimerasa (*Pyrococcus furiosus*), la cual presenta una actividad termoestable y de corrección (actividad exonucleasa 3' - 5', la cual corrige cualquier error producido durante la síntesis del ADN).²⁰

La actividad de éstas enzimas de ADN polimerasas depende de la concentración de iones Mg^{+2} libres, de los desoxirribonucleótidos y del pH del buffer de reacción. La cantidad de ADN polimerasa a usar en la reacción es uno de los factores más importantes que debe ser optimizado. Para la mayoría de ensayos usados en PCR la cantidad óptima de enzima fluctúa entre 0,5 y 2,5 unidades (U) en un volumen final de reacción de 20 - 100 μL .²⁰

d) **Ión magnesio (Mg^{+2}).** La PCR requiere iones de magnesio divalentes.

La concentración del ión Mg^{+2} libre (en la reacción es importante porque afecta la unión entre los oligonucleótidos iniciadores y el molde de ADN, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa y en la temperatura de hibridación. Es necesario, además considerar que los nucleótidos secuestran iones Mg^{+2} del medio, por lo que la concentración milimolar de este ión debe ser superior a la concentración de los nucleótidos. Algunas ADN polimerasas utilizan el ión Mn^{+2} en lugar del ión Mg^{+2} . La concentración óptima de $MgCl_2$ es de 1,5mM si se emplean concentraciones de 200 μM de cada uno de los dNTPs, no obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg^{+2} ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.²⁰

e) Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs). Los desoxirribonucleótidos trifosfatos libres (A, T, C, G) son esenciales para la reacción de síntesis de ADN. La concentración debe estar en el rango de 50 - 200 μM para cada desoxirribonucleótido a fin de tener una especificidad y fidelidad óptima a altas velocidades de incorporación. Cuando se tiene 200 μM de cada dNTP, hay suficiente material como para sintetizar 12,5 μg de ADN y sobra aún la mitad de los dNTPs. La concentración de cada uno de ellos en la mezcla de la reacción debe ser equimolar para minimizar los errores de una falsa incorporación de nucleótidos. Los dNTPs se quelan con el magnesio cambiando la concentración efectiva óptima del magnesio. Una concentración final superior a 50 mM de dNTPs en la PCR inhibe la actividad de la Taq ADN polimerasa.²⁰

f) Buffer de reacción. El buffer usado en la reacción de PCR debe ser elegido de acuerdo a la enzima a usar. Los componentes del buffer de reacción incluyen Tris-HCl, gelatina o albúmina sérica bovina (100 $\mu g/mL$) y detergentes no iónicos como el Tween 20 o Tritón X. Estos componentes pueden ser

utilizados a fin de estabilizar la actividad de la Taq ADN polimerasa.²⁰

g) Agua. Un factor muy importante en PCR es la calidad del agua utilizada en la reacción. Se sugiere utilizar únicamente agua de alta pureza, tridestilada, libre de ADN contaminante o de ADNasas. Todo lote de agua a utilizar debe guardarse en alícuotas.²⁰

h) Adyuvantes de la PCR. Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Los más usados son DMSO, glicerol, BSA. Este último a concentraciones por encima de 0,8 µg/µL incrementa la eficiencia de la PCR por incrementar la estabilidad de la Taq polimerasa.²⁰

Etapas.

En la actualidad, gracias a los adelantos tecnológicos se ha podido lograr una automatización del sistema de PCR, fundamentalmente debido al desarrollo de enzimas termoestables y termocicladores sofisticados que facilitan el proceso.²¹

Las copias del ADN molde se realiza bajo condiciones apropiadas requiriendo tres etapas térmicas, que constituyen un ciclo de amplificación:

Etapa I	Desnaturalización
Etapa II	Hibridación
Etapa III	Extensión

Durante los primeros ciclos de reacción, el ADN se desnatura por calor. Posteriormente, los oligonucleótidos iniciadores se unen selectivamente a las hebras del ADN por complementariedad y ocurre la "ex-tensión de las cadenas". Las nuevas hebras generadas durante la reacción poseen regiones complementarias a los iniciadores, generando así en cada ciclo de amplificación la síntesis exponencial del fragmento de ADN esperado. Debe indicarse que durante los primeros ciclos de amplificación se generan productos de longitud indefinida y solo a partir del tercer ciclo se empiezan a obtener los productos de longitud esperada.²⁰

Desnaturalización inicial. El tubo conteniendo la mezcla de reacción de PCR es sometido a altas temperaturas de 90 a 95 °C durante 4 a 10 minutos a fin de desnaturalizar todo el ADN e inactivar proteasas y ADNasas.²⁰

Desnaturalización (etapa 1). Consiste en incubar el tubo de reacción a una temperatura de aproximadamente 94°C y por 45 segundos (el tiempo depende del tamaño del ADN a amplificar). El objetivo de esta etapa es obtener moléculas de ADN de una sola hebra para que los oligonucleótidos iniciadores puedan unirse a las secuencias complementarias del ADN molde. La separación completa de las hebras del ADN durante esta etapa es crítica para la estabilidad y por ende para la actividad de la enzima.²⁰

El tiempo total que la enzima estará a estas temperaturas después del número de ciclos elegidos, no debe superar el tiempo de vida media de la enzima.²¹

Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los cebadores y una posterior extensión.²⁰

Hibridación (etapa 2). Los oligonucleótidos se unen a sus secuencias complementarias específicamente con la hebra de ADN molde previamente desnaturalizada. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar (depende de las características de los oligonucleótidos).²⁰

Es crítico que los cebadores hibriden en forma específica al molde. Los Oligonucleótidos iniciadores con contenido (G - C relativamente bajo 50%) requieren generalmente temperaturas de hibridación inferiores a 55°C. Por otro lado, los oligonucleótidos iniciadores con un alto contenido de G - C, pueden requerir temperaturas de hibridación más altas. La temperatura de hibridación es

uno de los parámetros críticos en la optimización de un ensayo de PCR. La temperatura hibridación (T_m , melting temperature) se puede determinar en forma empírica utilizando la siguiente fórmula:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

A, número de adeninas.

T, número de timinas.

G, número de guaninas.

C, número de citosinas.

Sin embargo, se recomienda determinar experimentalmente el T_m de cada set de oligonucleótidos iniciadores. Por tanto, la especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores con el ADN a amplificar es dependiente de: temperatura, concentración de ADN, oligonucleótidos iniciadores y Mg^{+2} .^{20 SAIKI}

Cabe mencionar, que al inicio de la reacción, la concentración de los oligonucleótidos iniciadores es elevada aumentando así la probabilidad de unirse al ADN a amplificar. Debe tenerse en consideración que temperaturas altas generalmente no permiten la unión de los oligonucleótidos iniciadores con el ADN a amplificar, debido a que el calor no permite la formación de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias; mientras que si la temperatura es baja, los iniciadores se hibridarán en forma inespecífica.^{20 SAIKI}

Polimerización (etapa 3). El ADN polimerasa termoestable añade sucesivamente nucleótidos al extremo 3' hidroxilo del oligonucleótido iniciador, teniendo como molde la hebra de ADN complementaria en sentido 5' a 3'. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 0,5 Kb y 40 segundos para fragmentos por encima de 1,2 Kb.²⁰

Polimerización final. Después del último ciclo de PCR se realiza a 72° C durante 10 minutos. Esta etapa permite que los productos de amplificación parcial terminen de complementarse.²⁰ Finalmente, las muestras pueden ser almacenadas a 4° C hasta su posterior análisis.²⁰

Ciclos de amplificación. El número de ciclos a usar durante la PCR se determina en base a la concentración del ADN molde, los oligonucleótidos iniciadores, los desoxirribonucleótidos y la enzima termoestable. Generalmente, estos ciclos se repiten entre 30 a 40 veces para obtener un producto que pueda ser fácilmente detectado en UD gel de agarosa o por hibridación.²⁰ Los ciclos repetidos de amplificación teóricamente conllevan a una síntesis exponencial de los fragmentos de ADN y están expresados en la siguiente fórmula:

$$Nc = (2^n - 2n) \times X$$

Nc	número de ciclos.
n	número de ciclos
2n	producto de extensión de tamaño determinado
X	número inicial de copias del ADN molde

Un número de ciclos excesivos conlleva al agotamiento temprano de los oligonucleótidos iniciadores y desoxirribonucleótidos. Mientras que un número deficiente de los mismos no permite la obtención del producto de amplificación.⁹

Visualización de los productos de amplificación. Los productos de amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa y luego visualizados por tinción con bromuro de estudio.²⁰

2.4.1 Variantes de PCR

a) XL-PCR. El XL-PCR, es un tipo especial de PCR denominado así por el gran tamaño de segmento de ADN a amplificar, en el PCR convencional normalmente se replican segmentos de cerca a 1000 pb, aquellos que tengan mayor tamaño

se denominan XL-PCR y obviamente se requiere de una ADN polimerasa potenciada con ingeniería genética que pueda sintetizar la hebra complementaria de tamaño grande y en tiempo aproximado de un minuto.^{22,23}

b) PCR ANIDADO. La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de primer o cebadores en cada una de ellas, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región del gen *CYP2D6* del ADN genómico de 2 900 pb, y utilizando este amplicón como ADN molde, se amplifica regiones específicas que se encuentran dentro de esta secuencia, utilizando primer internos que contiene el segmento diana.^{9,10}

c) PCR TETRAPRIMER. El locus de *CYP2D6* amplifica directamente una región del gen *CYP2D6* del ADN genómico, ofreciendo una detección rápida y sencilla de las variantes alélicas en estudio. Comprende cuatro cebadores para incrementar la especificidad de la detección.¹⁰

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre de 2013 a junio de 2014.

3.2 Definición de población y muestra

3.2.1 Población: La población estuvo constituido por todos los pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el año 2013.

3.2.2 Muestra: La muestra estuvo conformada por 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el periodo de ejecución del presente estudio, éstas fueron recolectadas en base a los criterios de inclusión. El material biológico fue sangre capilar impregnada en tarjetas FTA.

3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1 Recolección e identificación de la muestra

Se llenó la ficha de datos de los pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el año 2013, que voluntariamente aceptaron participar en el presente estudio, firmando la carta de consentimiento informado.

Se obtuvo la muestra, aplicando una punción en la yema del dedo dejando caer unas gotas de sangre capilar en una tarjeta de conservación de ADN (FTA™ Classic Card Whatman) previamente rotulada con el código de la persona muestreada, la codificación en la tarjeta FTA se asignó de acuerdo al siguiente formato: comunidad mestiza Ayacucho – Inicial del distrito – sexo – edad – y número correlativo de la toma de muestra.

Ejemplo: CMA – H – M – 35 – 001

Leyenda:

CMA: Comunidad Mestiza Ayacucho

H: Huamanga

M: Sexo

35: Edad en años

001: Número correlativo de la muestra.

Ésta tarjeta se mantuvo conservada en una caja térmica, para su transporte al laboratorio y posterior procesamiento.

3.3.2 Obtención de ADN a partir de sangre capilar en tarjeta FTA.

Se procedió con los pasos descritos en el protocolo para el kit de extracción de ADN: WB120204 Whatman™ FTA Purification Reagent, luego fueron guardadas a -70 °C por criopreservación.

PROCEDIMIENTO:

1. Se desinfectó el pulpejo del dedo del paciente con algodón embebido en alcohol, se dejó evaporar y se aplicó una punción con la ayuda de una lanceta estéril.
2. Las gotas de sangre capilar se dejaron caer sobre la superficie circular indicada en las tarjetas de FTA GeneCard, se secó al medio ambiente durante 1 hora o toda la noche.

3. Usando el perforador micro punch TM de 1.2 mm, se removió la muestra impregnada en la tarjeta FTA, colocando éste fragmento (punch) en un tubo eppendorf de 1.5 ml (tres punch por tubo).
4. Se adicionó 200 ul de la solución de purificación FTA, para tres punch por tubo, se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, se agitó dos veces suavemente en vórtex.
5. Utilizando una micropipeta se desechó todo el reactivo posible, de ser necesario se utilizó papel secante.
6. Se repitió los pasos 4 y 5, tres veces o más, hasta que los punches queden de color blanco.
7. Luego se adicionó 200 ul de buffer TE 1X, se dejó incubar 5 min. a temperatura ambiente y se agitó suavemente en la mano dos o más veces.
8. Utilizando la micropipeta se desechó todo el buffer TE 1X.
9. Se repitió los pasos 7 y 8, tres veces o más.
10. Se dejó secar los punch, de ser necesario utilizando papel secante.
11. Las muestras de ADN extraídas mediante la solución de purificación de FTA no requieren cuantificación.

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Dentro de la cabina de pre PCR esterilizada previamente con radiación ultra violeta durante 20 min, se preparó el "máster mix" con la fórmula establecida, se agitó y repartió en los tubos PCR de 200 µL los volúmenes calculados, estos se retiraron de la cabina y en la mesa de trabajo se procedió a agregar el ADN molde, impregnados en el punch de las tarjetas FTA.

3.4.1. Estandarización de XL-PCR para la amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, con 1, 2 y 3 punch de tarjeta FTA que contiene ADN molde impregnado.

La fórmula del "mix" para una reacción con un volumen final de 50 μL , se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO_4 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw (forward) 5'CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA3' 0,5 μM , primer Rv (reverse) 5'GGCTGGGTCCCAGGTCATAC3' 0,5 μM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 2,0 U, número de punch conteniendo ADN de sangre capilar (1, 2 y 3 punch por tubo N° 1, N° 2 y N° 3 respectivamente).

Se colocaron los tubos en el termociclador y programó el equipo con las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 45 s y 70 °C por 2 min, seguidos por 10 min a 70 °C para la extensión final.

Para la detección de los productos del XL-PCR de 2 900 pb, fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % a 60 voltios durante 90 minutos, estos geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio al 1 % y dos enjuagues suaves con agua corriente, los productos del XL-PCR se observaron por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, y adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de ADN.

3.4.2 Estandarización de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, a partir del producto XL-PCR (amplificación) como ADN molde con volúmenes de 5 μL y 10 μL .

La fórmula del "mix" para una reacción con un volumen final de 50 μL , se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgCl_2 1,5 mM

desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2mM, primer Fw
5'CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAACAAG3' 0,5µM, primer Rv
5'GAGACTCCTCGGTCTCTCG3' 0,5 µM y Taq ADN polimerasa 1 U, el ADN molde fue el amplicón (producto del XL-PCR) y se trabajó con los volúmenes de 5 µL y 10 µL para cada tubo respectivamente.

Se colocaron los tubos en el termociclador y programó el equipo con las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 10 s y 72°C por 1 min, seguidos por 5 min a 70 °C para la extensión final.

Los productos del XL-PCR anidado con cada una de las condiciones físicas y químicas ensayadas, presentes en los geles de agarosa al 3 % se tñieron con bromuro de etidio al 1 % y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se observaron por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de los productos de amplificación de ADN.

3.4.3 Estandarización de PCR tetraprimer para la detección del alelo CYP2D6*3, con punch de tarjeta FTA que contiene ADN molde impregnado.

La fórmula del "mix" para una reacción con un volumen final de 25 µL, se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,4 mM, primer CYP2D6*3-3
5'GCGGAGCGAGAGACCGAGGA3' 0,12µM, CYP2D6*3-4 *new*
5'GGTCCGGCCCTGACACTCCTTC3' 0,12µM, CYP2D6*3-6
5'GCTAACTGAGCACG3' 0,3 µM, CYP2D6*3-awt **5'TCCCAGGTCATCCT3'** 0,3 µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,25 U, tres punches conteniendo ADN de sangre capilar, para cada tubo.

Se colocaron los tubos en el termociclador y programando el equipo con los datos planteados para cada caso, se puso en marcha la replicación de los fragmentos de ADN.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 63°C por 30 s y 72 °C por 1 min, y luego 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 53°C por 30 s 72 °C por 1 min.

Se detectaron los productos PCR tetraprimer con cada una de las condiciones físicas y químicas ensayadas, fueron corridas por electroforesis en gel de agarosa al 3 % a 60 voltios durante 90 minutos, estos geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio al 1% y dos enjuagues suaves con agua corriente, los productos del PCR tetraprimer se observaron por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, y adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de ADN.

3.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se procedió a interpretar los registros fotográficos, de los geles de agarosa conteniendo los productos de amplificación de los fragmentos del gen *CYP2D6*, por XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer, para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, respectivamente.

III. RESULTADOS

Tabla 2. Detección del Gen *CYP2D6*, alelos: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, y genotipos; mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho – 2013.

DETECCIÓN DE GEN Y ALELOS EN PACIENTES CON TBC	TÉCNICA DE PCR		
	XL-PCR	ANIDADO	TETRAPRIMER
	Gen: <i>CYP2D6</i>	Alelos: <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*6</i>	Alelo: <i>CYP2D6*3</i>
		Genotipo: <i>*1/*1</i> ó <i>*1/*4</i> ó <i>*1/*6</i> .	Genotipo: <i>*1/*3</i>
Presente	20	17	3
Ausente	0	3	17
TOTAL	20	20	20

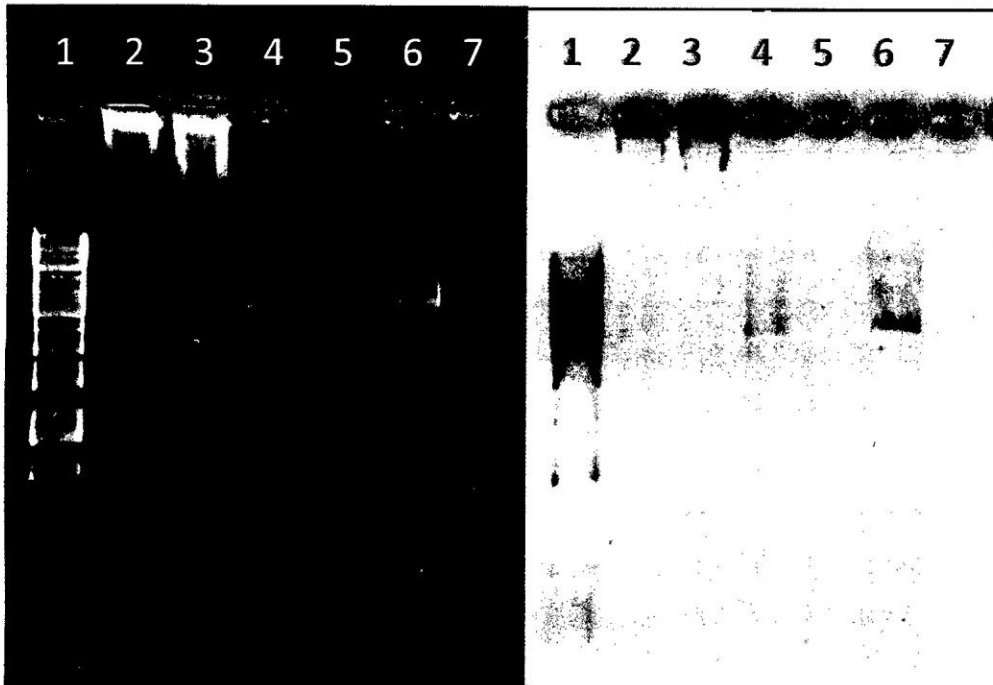


Figura 1: Productos de la amplificación de fragmento de 2 900 pb del gen *CYP2D6* mediante XL-PCR con 1, 2 y 3 “punch” de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA, en gel de agarosa al 1,5 %.

Leyenda de la figura 1:

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con un “punch”

Carril 3: con dos “punch”

Carril 4: con tres “punch”

Carril 5: con Blanco

Carril 6: con el control.

Carril 7: con ADN Genómico

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 60 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

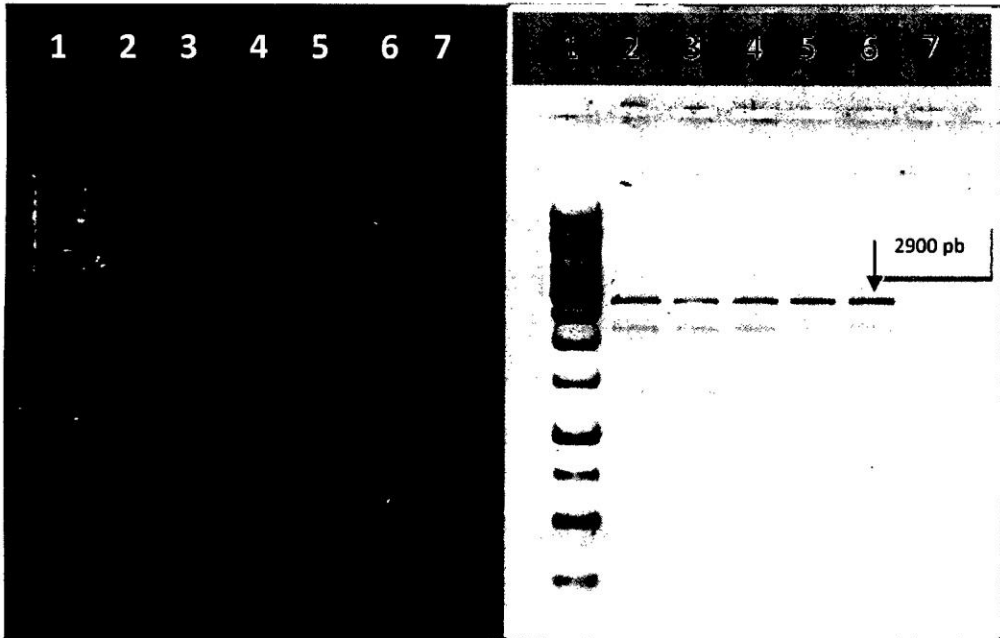


Figura 2: Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de cinco pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.

Leyenda de la figura 2

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con muestra del paciente 01

Carril 3: con muestra del paciente 02

Carril 4: con muestra del paciente 03

Carril 5: con muestra del paciente 04

Carril 6: con muestra del paciente 05

Carril 7: con blanco.

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 60 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% por 10 min.

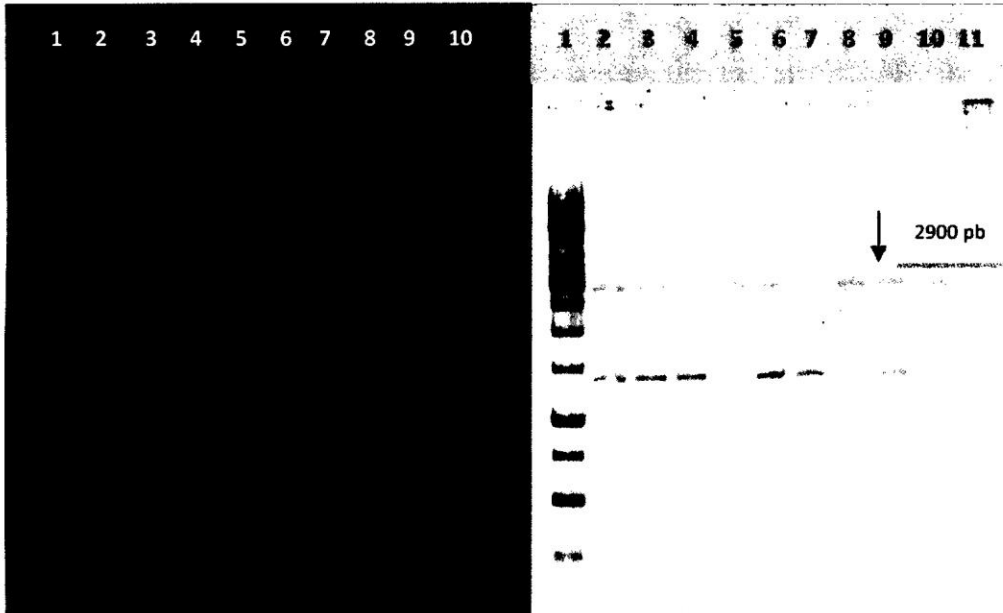


Figura 3: Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de nueve pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.

Leyenda de la figura 3

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 06
- Carril 3: con muestra del paciente 07
- Carril 4: con muestra del paciente 08
- Carril 5: con muestra del paciente 09
- Carril 6: con muestra del paciente 10
- Carril 7: con muestra del paciente 11
- Carril 8: con muestra del paciente 12
- Carril 9: con muestra del paciente 13
- Carril 10: con muestra del paciente 14
- Carril 11: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 60 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

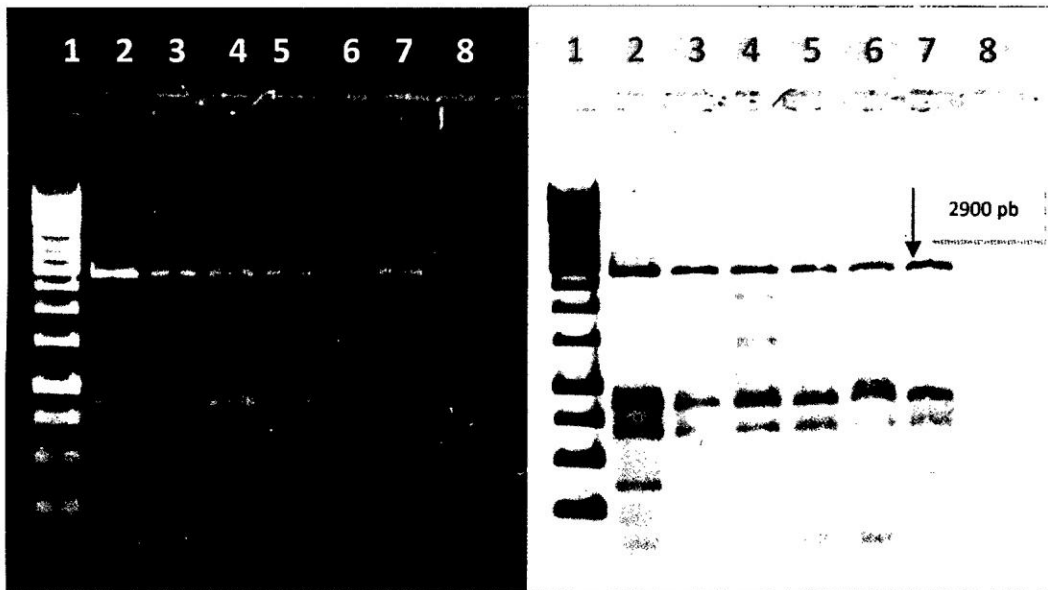


Figura 4 : Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de seis pacientes, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.

Leyenda de la figura 4

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con muestra del paciente 15

Carril 3: con muestra del paciente 16

Carril 4: con muestra del paciente 17

Carril 5: con muestra del paciente 18

Carril 6: con muestra del paciente 19

Carril 7: con muestra del paciente 20

Carril 8: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 60 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

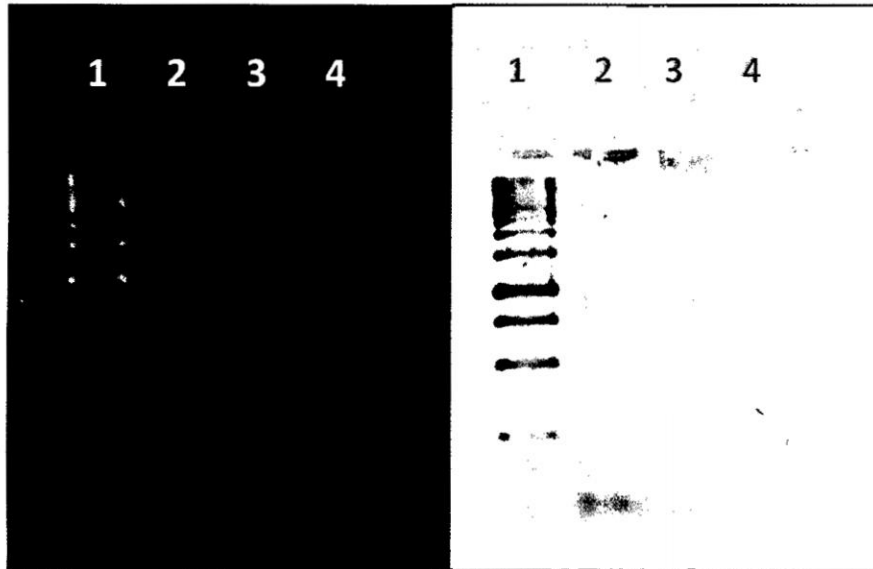


Figura 5: Productos de amplificación de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, con diferentes volúmenes del producto XL – PCR (amplicón) como ADN molde, en gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 5

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con 05 μ L del amplicón

Carril 3: con 10 μ L del amplicón

Carril 4: con blanco.

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

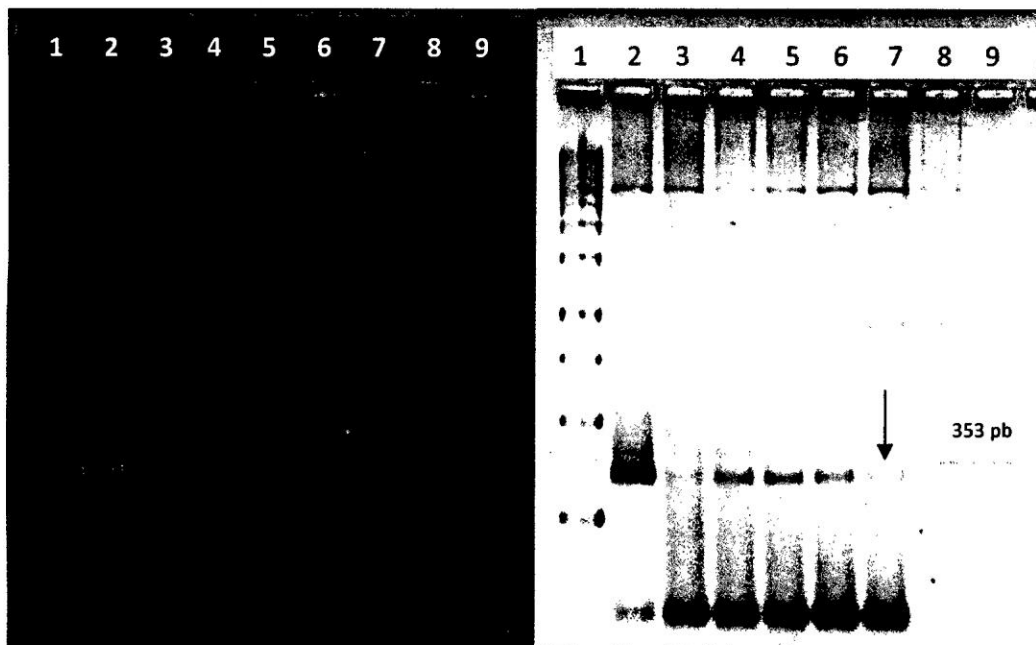


Figura 6: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 6

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 01
- Carril 3: con muestra del paciente 02
- Carril 4: con muestra del paciente 03
- Carril 5: con muestra del paciente 04
- Carril 6: con muestra del paciente 05
- Carril 7: con muestra del paciente 06
- Carril 8: con muestra del paciente 07
- Carril 9: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

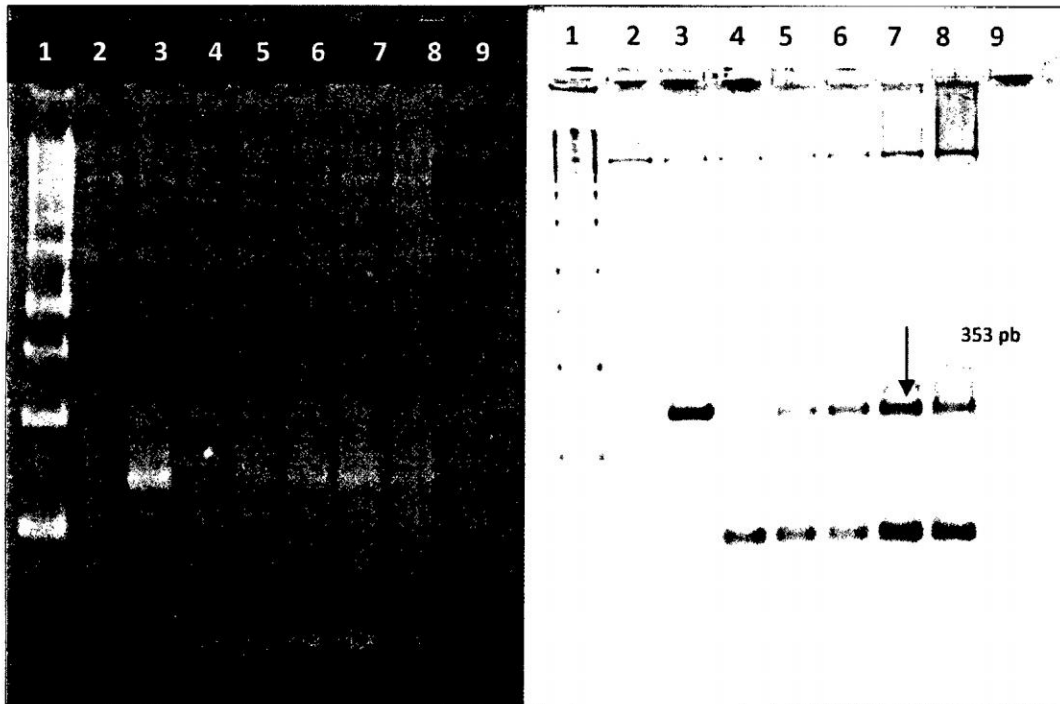


Figura 7: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 7

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 08
- Carril 3: con muestra del paciente 09
- Carril 4: con muestra del paciente 10
- Carril 5: con muestra del paciente 11
- Carril 6: con muestra del paciente 12
- Carril 7: con muestra del paciente 13
- Carril 8: con muestra del paciente 14
- Carril 9: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L
 Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.
 Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

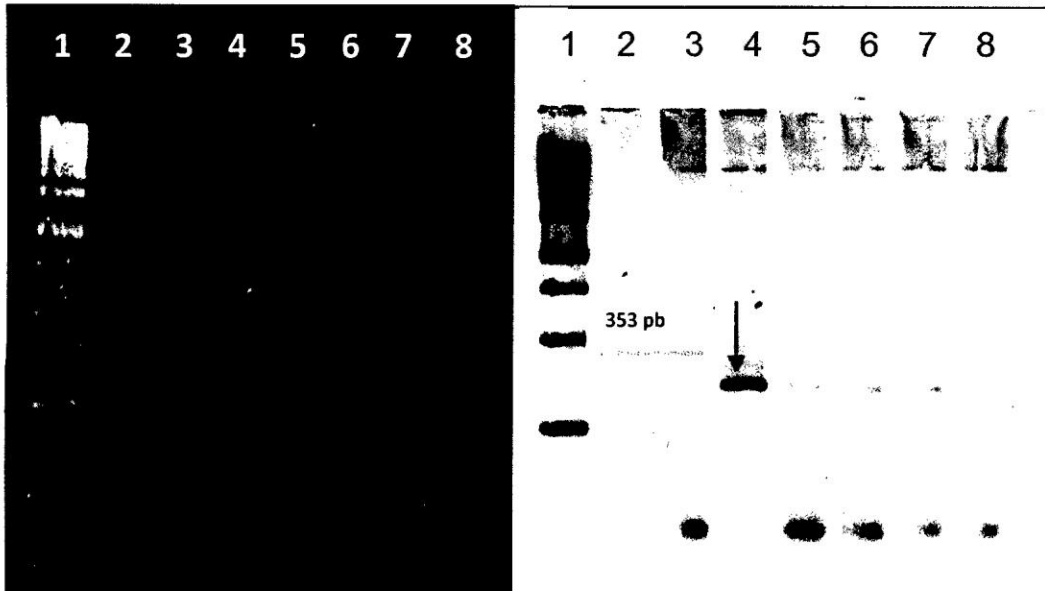


Figura 8: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de seis pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 8

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con blanco

Carril 3: con muestra del paciente 15

Carril 4: con muestra del paciente 16

Carril 5: con muestra del paciente 17

Carril 6: con muestra del paciente 18

Carril 7: con muestra del paciente 19

Carril 8: con muestra del paciente 20

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

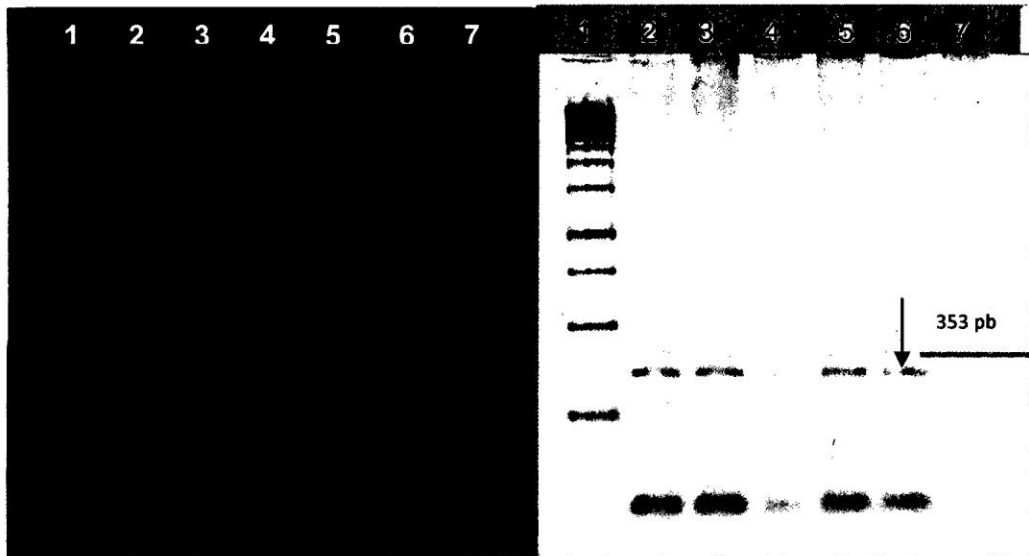


Figura 9: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de tres pacientes(duplicado), mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 9

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 07
- Carril 3: con muestra del paciente 07
- Carril 4: con muestra del paciente 15
- Carril 5: con muestra del paciente 08
- Carril 6: con muestra del paciente 08
- Carril 7: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L
 Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.
 Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

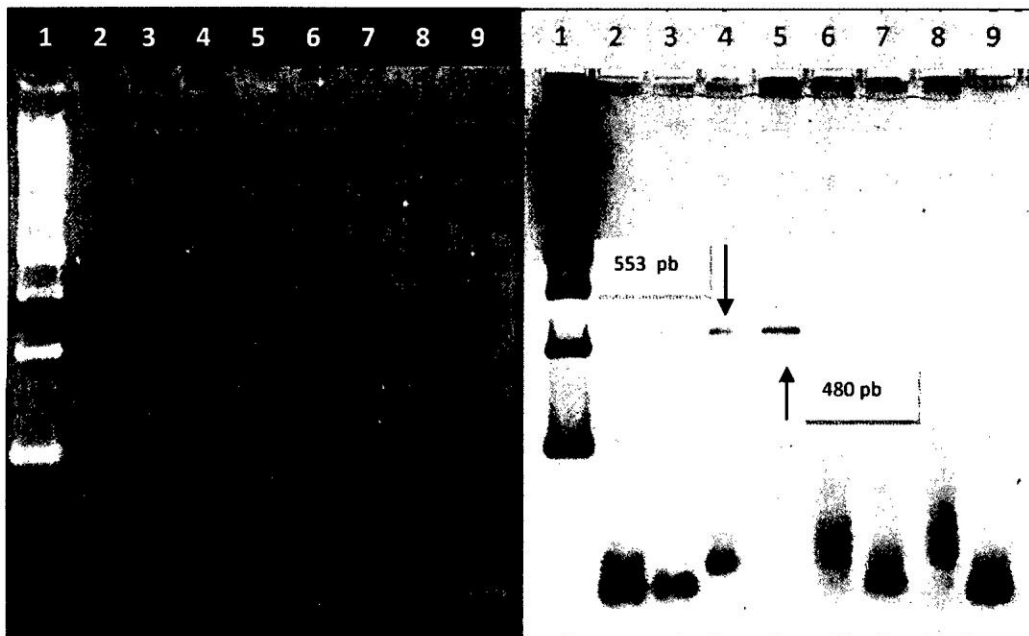


Figura 10: Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 10

Carril 1: con *ladder* 1Kb

Carril 2: con muestra del paciente 01

Carril 3: con muestra del paciente 02

Carril 4: con muestra del paciente 03

Carril 5: con muestra del paciente 04

Carril 6: con muestra del paciente 05

Carril 7: con muestra del paciente 06

Carril 8: con muestra del paciente 07

Carril 9: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

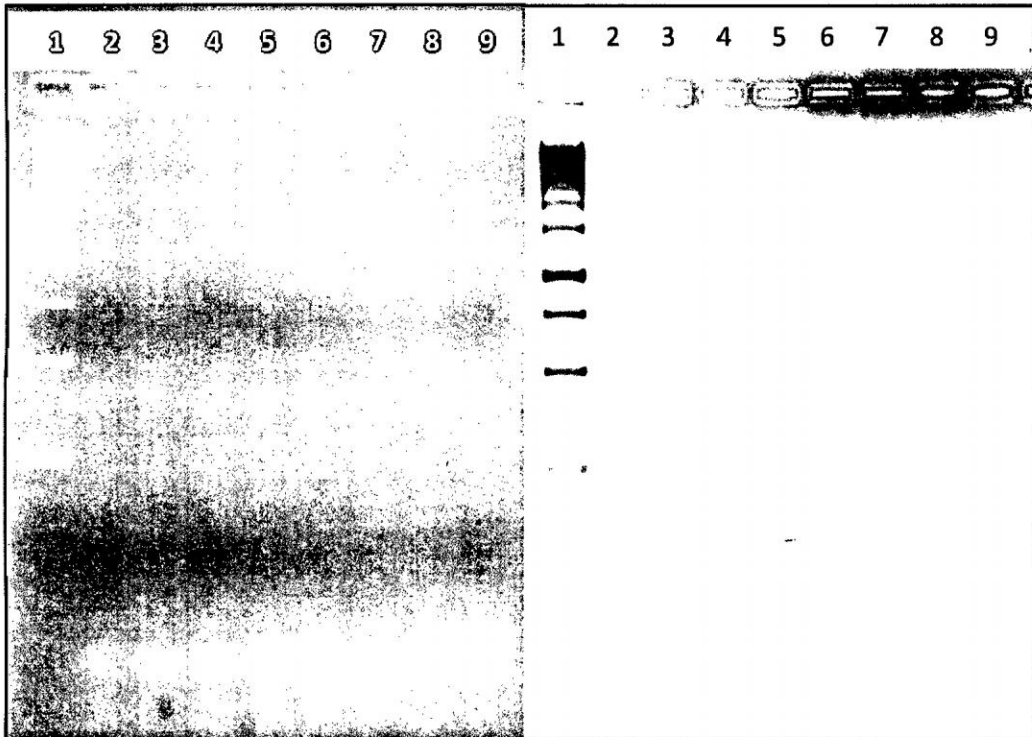


Figura 11: Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 11

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 08
- Carril 3: con muestra del paciente 09
- Carril 4: con muestra del paciente 10
- Carril 5: con muestra del paciente 11
- Carril 6: con muestra del paciente 12
- Carril 7: con muestra del paciente 13
- Carril 8: con muestra del paciente 14
- Carril 9: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

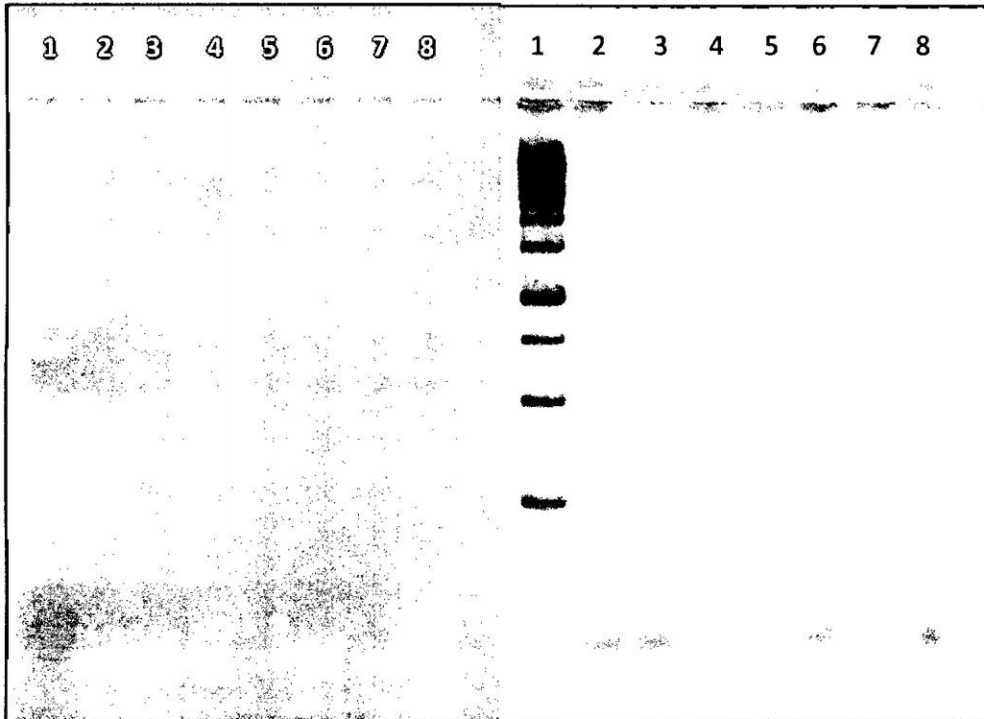


Figura 12: Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de seis pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %.

Leyenda de la figura 12

- Carril 1: con *ladder* 1Kb
- Carril 2: con muestra del paciente 15
- Carril 3: con muestra del paciente 16
- Carril 4: con muestra del paciente 17
- Carril 5: con muestra del paciente 18
- Carril 6: con muestra del paciente 19
- Carril 7: con muestra del paciente 20
- Carril 8: con blanco

Volumen de carga: Muestra (15 μ L) + loading (2 μ L) = 17 μ L

Condiciones de electroforesis: 60 voltios por 90 min.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1 % por 10 min.

V. DISCUSIÓN

Los productos de amplificación de segmentos de ADN correspondiente al gen *CYP2D6*, por medio de las diferentes técnicas variantes de PCR, se corrieron en gel de agarosa y se tomaron los registros fotográficos, para la interpretación respectiva que se detalla a continuación.

La tabla 2 representa los resultados de la detección del Gen *CYP2D6*, alelos: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, y genotipos; obtenidos mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, durante el periodo de ejecución del presente estudio, a partir de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.

El gen *CYP2D6* fue detectado mediante la técnica de XL-PCR, cuyos primers amplificaron un fragmento de 2 900 pb, determinando la presencia del gen en los 20 pacientes, la eficiencia de los componentes del "mix" y programación de las condiciones de amplificación, consecuentemente la obtención del amplicón, que sirvió como ADN molde para la siguiente técnica de PCR anidado, utilizándose otros dos primers, para secuencias de nucleótidos internos del amplicón, que permitieron amplificar un fragmento de 353 pb, en 17 de los 20 pacientes, que indica la presencia de alelos: *1, *4 ó *6, cuya discriminación se realizaría con una digestión enzimática utilizando nucleasa BstNI (que lamentablemente no se pudo adquirir porque no existe en el mercado nacional).

La detección de éste fragmento, nos permite deducir que el genotipo de cada una de las 17 personas, estaría incluida dentro de las tres posibilidades: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6, es decir heterocigotos. Todos tienen al menos un alelo *1 que es el silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal; y cabe la posibilidad que el otro alelo de cada uno de ellos pueda ser: *1 alelo silvestre con metabolismo normal, *4 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica, y *6 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica.

La probabilidad de hallar variantes alélicas *1/*4 ó *1/*6, luego de la digestión enzimática para la respectiva identificación de los productos de la amplificación con PCR anidado, estaría relacionados con los estudios realizados por Grimán,¹⁰ Alanis,¹¹ Heras¹² y Bañuelos¹³, que mencionamos a continuación:

Grimán¹⁰, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centrooccidental de Venezuela, teniendo como resultado el alelo más frecuente *CYP2D6*4* con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas.

Alanis¹¹, realizó estudios del polimorfismo gen *CYP2D6* en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango México, determinando las frecuencias de las variantes alélicas *CYP2D6*4*, *6 y *10.

Heras¹², Realizó estudios en pobladores sanos del Ecuador, acerca de la identificación del polimorfismo de un solo nucleótido en el gen *CYP2D6* del citocromo P450, comprobándose que la frecuencia de alelos *4 (8,5%) y *5 (2,2%) es similar a la reportada en estudios en población caucásica y mestizos hispanos obteniendo como resultado la existencia de polimorfismos genéticos de *CYP2D6* en la población ecuatoriana.

En México el estudio realizado por Bañuelos¹³, sobre las frecuencias de las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en Menonitas, resultaron ser con mayor

frecuencia los alelos *4 y *10, los cuales fueron similares a las reportadas en los caucásicos.

El PCR tetraprimer fue procesado con ADN genómico de sangre capilar impregnada en el punch de la tarjeta FTA, de cada uno de los 20 pacientes que ingresaron al estudio, que sirvió como ADN molde para cuatro primers con diana en las secuencias internas del gen *CYP2D6*, detectándose en tres de los 20 pacientes, dos bandas de productos de amplificación de 553 pb y 480 pb que corresponde a los alelos *1 y *3, respectivamente.

Al visualizarse las dos bandas en cada una de las muestras de los tres pacientes nos revela que el genotipo es heterocigoto *1/*3, con un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal, y *3 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica.

Los resultados obtenidos, en la detección de tres casos de pacientes heterocigotos *1/*3, coinciden con lo planteado por Sachse⁹, que existe alrededor de 20 polimorfismos con el fenotipo MP, de los cuales aproximadamente el 95% corresponden a los alelos *3, *4, *5 y *6, en individuos caucásicos, siendo el alelo con mayor frecuencia el *4, seguido de la variante *3 y la variante *6.

Así mismo Grimán¹⁰, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centrooccidental de Venezuela, en la que no detectó ningún caso de variantes *CYP2D6**3.

La figura 1 representa el primer ensayo realizado para la estandarización de XL-PCR del gen *CYP2D6*, tomando como ADN molde, el ADN extraído de sangre capilar que se encontraba impregnada en la tarjeta FTA, de la cual se obtuvieron discos de 2 mm de diámetro a los que le denominamos "punch"; el carril 1, corresponde al marcador de tamaño molecular "ladder" de 1 Kb, los carriles 2, 3 y 4 contiene el ADN molde en los "punch", con uno, dos y tres "punch"

respectivamente, muestra los productos de la amplificación en bandas definidas directamente relacionado al número de "punch", revelando que para el XL- PCR es necesario incorporar al tubo del "mix" tres punch por paciente, puesto que el producto amplificado es bastante grande de aproximadamente 2 900 pb. El carril 5 no manifiesta ningún producto de la reacción, es el "blanco" sin "ADN molde", solo contiene el "mix" indicándonos que no hay contaminación ni reacciones cruzadas; el carril 6 muestra una banda definida de 2 900 pb, es el "control" que se amplificó con ADN molde extraído de linfocitos humanos mediante extracción orgánica; el carril 7 contiene solo el ADN genómico extraído de linfocitos humanos.

Las figuras 2, 3 y 4, muestran los productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de los 20 pacientes que ingresaron al estudio, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar por cada paciente, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5%. Las figuras 2, 3 y 4 corresponden a los pacientes de 1 al 5, del 6 al 14 y del 15 al 20, respectivamente; cada una de ellas mostrando el ladder y blanco. Estos resultados revelan que el fragmento del gen *CYP2D6* ha sido amplificado en la totalidad de los pacientes que ingresaron en estudio, que nos permitirá continuar con la siguiente etapa de PCR anidado, puesto que éste producto (amplicón) será utilizado como ADN molde.

La figura 5 revela los productos de amplificación de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, con diferentes volúmenes del producto XL – PCR (amplicón) como ADN molde, en gel de agarosa al 3,0%; como se puede apreciar las bandas del producto del PCR anidado, son más intensas con 10µL de ADN molde (carril 3) que con 5µL del carril 2, correlacionando con el ladder del carril 1 y contrastando con el "blanco" del carril

4; por tanto resulta una mejor reacción, cuando se procesa con el volumen de 10µL de ADN molde (amplicón).

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de los 20 pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6**1 (silvestre) y alelos mutantes *CYP2D6**4 y *CYP2D6**6, en gel de agarosa al 3,0%, utilizando como ADN molde el amplicón del XL-PCR del gen *CYP2D6*; las figuras 6, 7 y 8 corresponden a los pacientes de 1 al 7, del 8 al 14 y del 15 al 20. Estos resultados reflejan que todos los pacientes en estudio muestran al menos un alelo silvestre y/o heterocigoto, que corresponde a: silvestre/silvestre, silvestre/*4 y silvestre/*6.

La figura 9, representa la duplicidad de las muestras de los productos de amplificación de 353pb de los pacientes 7,15 y 8 respectivamente, quedando comprobado la presencia de al menos un alelo silvestre y/o heterocigoto, que corresponde a: silvestre/silvestre, silvestre/*4 y silvestre/*6, de la totalidad de los pacientes en estudio.

La figura 10, representa los productos de amplificación de 553 pb y 480 pb, del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6**3, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3,0%. Los carriles 3, 4 y 5 corresponde a los pacientes que presentan un alelo silvestre y otro mutante *3, constituyendo personas heterocigotas para el gen *CYP2D6*, los carriles 2, 6, 7 y 8 son pacientes que no presentan alelos mutantes *3, el carril 1 es del ladder y el carril 9 del blanco.

Las figuras 11 y 12, no muestran los productos de amplificación de 553 pb y 480 pb, del fragmento del gen *CYP2D6* de pacientes del 8 al 14 y 15 al 20, respectivamente; mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6**3, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar,

corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3,0%, cada figura muestra en el carril 1 el ladder y el último carril para el blanco. Demostrándonos que ninguno de estos pacientes muestra alelo mutante *3.

VI. CONCLUSIONES

- El perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, corresponde a 17 pacientes con genes heterocigotos, dentro de las tres posibilidades: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6; y tres pacientes con genes heterocigotos *1/*3.
- La estandarización de las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa, son las siguientes:

Para XL-PCR amplificando un fragmento del gen *CYP2D6*; contenido del "mix" para un volumen final de 50 μ L: buffer 1X, $MgSO_4$ 1,5 mM, desoxirribonucleósidostrifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw (sentido) 0,5 μ M, primer Rv (antisentido) 0,5 μ M y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,5 U, ADN molde tres "punch"; programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 65,0 °C por 45 s y 70 °C por 2 min, seguidos por 10 min a 70 °C para la extensión final.

Para PCR anidado, para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*; contenido del "mix" para un volumen final de 50 μ L: buffer 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, desoxirribonucleósidostrifosfatos (dNTPs) 0,2mM, primer Fw 0,5 μ M, primer Rv 0,5 μ M y Taq ADN polimerasa 1 U, el ADN molde (amplicón del XL-PCR) 10 μ L; programa de amplificación: desnaturalización

inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 10 s y 72°C por 1 min, seguidos por 5 min a 70 °C para la extensión final.

Para PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*3*; el "mix" para una reacción con un volumen final de 25 µL, conteniendo: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM desoxirribonucleósidostrifosfatos (dNTPs) 0,4 mM, primer *CYP2D6*3-3* 0,12µM, primer *CYP2D6*3-4 new* 0,12µM, primer *CYP2D6*3-6* 0,3 µM, primer *CYP2D6*3-awt* 0,3 µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,25 U, tres punches conteniendo ADN de sangre capilar, para cada tubo. La programación fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 63°C por 30 s y 72 °C por 1 min, y luego 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 53°C por 30 s 72 °C por 1 min.

- Las variantes alélicas detectadas en 17 pacientes corresponde a: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 y tres pacientes con *1/*3; es decir todos presentan genotipos heterocigotos, por tanto todos tienen al menos un alelo *1 que es el silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal.

VII.RECOMENDACIONES

- Estandarizar las técnicas de los siguientes procesos, como la digestión enzimática con nucleasas a los productos del PCR anidado, que permita discriminar alelos *1 silvestre, *4 mutante y *6 mutante, con la adquisición de la citada enzima por vía exportación directa.
- Ampliar el estudio de las variantes alélicas del gen *CYP2D6*, con pacientes que presenten alelos mutantes con ausencia total de actividad metabólica, conducente a tratamiento individualizado de pacientes con estos casos especiales.

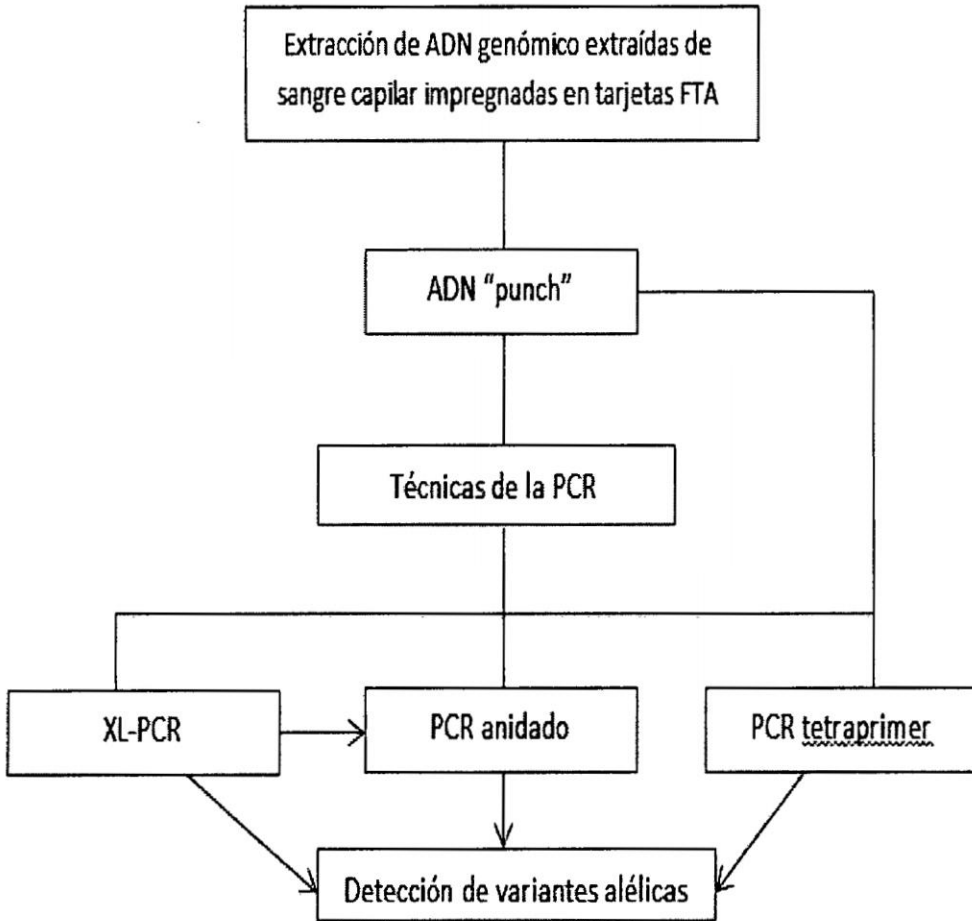
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization. Health situation in the Americas, Basic Indicators. 2005. www.paho.org. (accedido en septiembre 2006).
2. Ministerio de Salud del Perú (MINSA). Tuberculosis en el Perú. Informe 2000. Dirección General de Salud de las Personas, Programa Nacional de Control de Enfermedades Transmisibles/Control de la Tuberculosis. Lima. 2000.
3. Ding X , Kaminsky L. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. Annu.2003.
4. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004.
5. Demirci H, Shields C L, Shields J A, Eagle R C Jr. Ocular tuberculosis masquerading as ocular tumors. Surv Ophthalmomol 2004; 49: 78-89.
6. Sahu G, Mishra N, Bhuita R, Mohanty A. Manifestations in ocular tuberculosis. Ind J Tub 1998; 45: 153-4.
7. Roche Diagnostics. Estudio exploratorio del efecto de tamoxifeno sobre la concentración plasmática de su principal metabolito activo (endoxifeno) en pacientes con cáncer de mama hormonodependiente portadoras de un genotipo de cyp2d6 "metabolizador lento". [revista en internet].2008 [acceso Junio de 2009] Disponible en: www.roche.com.pe/portal/synergy/static/file/.../11rdijun2008.pdf
8. Mendoza R, Wan Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman N. polymorphism in a Mexican American population. 2001.
9. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: 1998.
10. Grimán P, Moran Y, Camargo M y Chiurillo M. Caracterización de variantes alélicas de citocromo CYP2D6 en la población de la región centroccidental de Venezuela. 2009.[revista en internet].2009 [acceso Enero de 2009] Disponible en: www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/download/.../10311
11. Alanis R, Lares I, Sosa M ,Alvarez F, y Lazalde B. Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México.[revista en internet]. 2007 [acceso Abril de 2014] Disponible: en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=101&IDARTICULO=18745&IDPUBLICACION=1918>
12. Heras G. Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen CYP2D6 del citocromo P450, en población sana del Ecuador. 2010.
13. Bañuelos A, Lares A, Sosa M, Bradley A, Lazalde R. Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México. [revista en internet]. 2007. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://www.redalyc.org/pdf/142/14290204.pdf>
14. Rodríguez A, Garcia J, Martínez M Y Conesa Z. Papel del citocromo P450 en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antihipertensivos. 2010.
15. Bárbaro Pérez, Mayra Álvarez, Pedro Dorado y Adrián Llerena. Estudio farmacogenético del polimorfismo metabólico de la debrisoquina (CYP2D6) en la población cubana en relación con la española. 2005.

16. Kato-Maeda M, Bifani P, Kreiswirth B, Small P. 2001. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*. Mar;107(5):533-7. 2001
17. Rattan A, Kalia A, Ahmad Bañuelos A, Lares A, Sosa M, Bradley A, Lazalde R. Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México. 2007.
18. Ding X , Kaminsky L. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu*. 2003.
19. LLerena A, Cobaleda J, Martínez C, Benitez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. *Eur J DrugMetabPharmacokinet*. [revista en internet]. 1996. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
20. Saiki R, Gelfand D, Stoffel, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Ehrlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491. 1988.
21. Bernard S, Neville K, Nguyen AT, Flockhart D. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population. 2006.
22. Menoyo A, Baiget M. Caracterización de variantes alélicas del citocromo CYP2D6 en una comunidad española. 2005.
23. Heras G. Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen CYP2D6 del citocromo P450, en población sana del Ecuador. 2010.

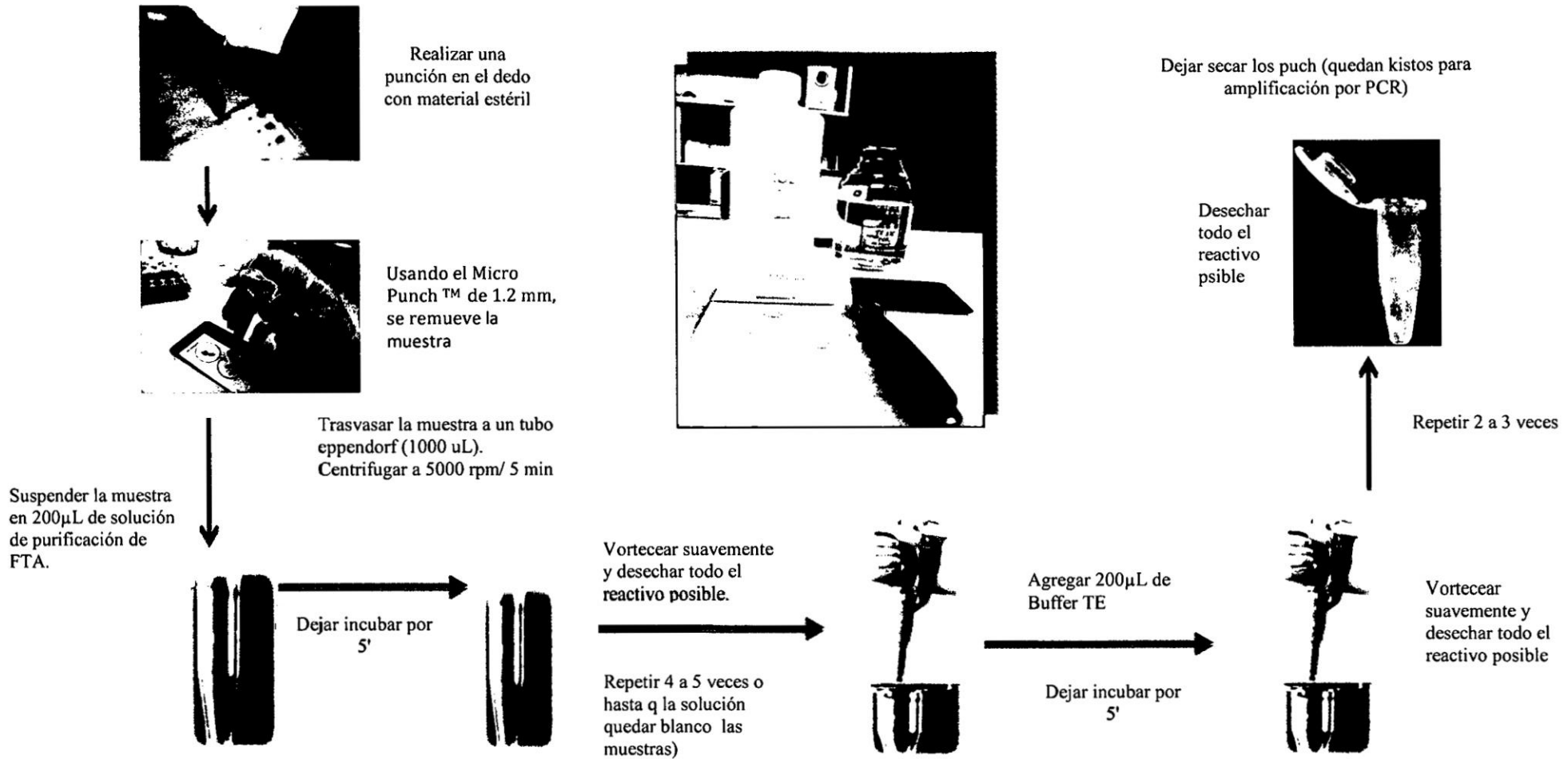
ANEXOS

Anexo 1



Flujograma para la detección del Gen *CYP2D6*, alelos: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, y genotipos; mediante las técnicas variantes de PCR.

ANEXO 2 EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE CAPILAR EN TARJETAS FTA



Anexo 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUAL PARA COMUNIDADES NATIVAS Y MESTIZAS

Proyecto: Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho - Perú.

Presentación

Mi nombre es..... y trabajo en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, estamos realizando un estudio sobre las variaciones genéticas del poblador nativo y mestizo peruano en la región Ayacucho. El estudio se va realizar en los ámbitos de las comunidades..... usted tiene derecho a preguntar sobre cualquier riesgo o beneficio de este estudio para usted, su familiar y sobre cualquier otro punto que no esté claro. Cuando hayamos respondido todas sus dudas, usted tiene el derecho de decidir si usted puede participar o no.

¿Cuál es el propósito de esta investigación?

Nuestro cuerpo, así como el cuerpo de los animales y plantas están formados por células. Estas contienen a nuestros genes, que heredamos como características de nuestros padres o ancestros. Los genes de una persona comparados a los de otra persona no son totalmente idénticos, estas diferencias son conocidas como variaciones genéticas. Estas variaciones explican algunas de las diferencias físicas entre las personas y explican parcialmente por qué algunas personas o familias pueden tener problemas o enfermedades al tomar medicamentos. Sufrir esas enfermedades también puede depender de lo que comamos, de hacer ejercicio o no, de fumar tabaco, ó de la contaminación que exista en la comunidad, y otras condiciones, lo que dificulta encontrar que genes podrían estar involucrados en estas respuestas a los medicamentos.

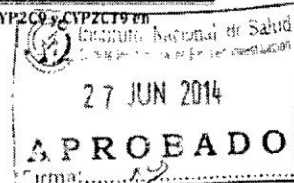
Estas diferencias en los genes también pueden observarse si nos comparamos con personas de otros países lejanos. Así como hay diferencias también hay similitudes, y en algunas personas o comunidades hay más diferencias que en otras. El propósito de la *Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú*, que incluye tres tesis de postgrado y una tesis de pregrado, es encontrar la mayoría de diferencias en los genes que existen en las poblaciones nativas peruanas y cuanto de estos genes se encuentra en las poblaciones mestizas peruanas. Esto se realizará mediante el estudio de los genes presentes en las muestras del hisopado bucal colectadas en personas de las comunidades de Ayacucho. Posteriormente toda la información de las variaciones en los genes que se encuentren se colocará en bases de datos para investigadores de acceso regulado en Internet.

La información que se desarrollen con este estudio podrá servir para que en el futuro los investigadores contribuyan al conocimiento de la salud y de las enfermedades que sufren nuestra población en la utilización de medicamentos. Para caracterizar sus genes, los investigadores analizarán sus muestras, para buscar las variaciones genéticas relacionadas. Una vez identificadas, se podrá estudiar cómo funcionan y eventualmente encontrar mejores métodos para prevenir, detectar y evitar el uso de medicamentos que pueden causar enfermedades. Asimismo este proyecto servirá para conocer mejor la historia de las poblaciones peruanas nativas y mestizas, su origen y evolución.

Este es un proyecto de investigación, no un servicio de asistencia médica. Si usted tiene algún problema de salud o alguna pregunta médica, debe consultarlo con un médico en un Centro de Salud más cercano a su comunidad.

Los participantes de este proyecto son hombres y mujeres mayores de 18 años, solo se necesita que estén de acuerdo. Este proyecto incluirá aproximadamente 175, 140 y 275 participantes de cada población, andina, asháninka y mestiza respectivamente, en total serán incluidos 560 participantes de Ayacucho. La Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y la Dirección Regional de Salud de Ayacucho, serán las instituciones que participarán en la captación de los participantes

Título del Protocolo " Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú",
Fecha: 17/06/2014
Versión: Cuarta



Página 3

Carta de consentimiento informado individualizado

Para formar parte del proyecto, usted debe:

- Ser mayor de edad (tener más de 18 años).
- Estar dispuesto a donar una muestra de hisopado bucal.
- Estar de acuerdo en que nuestros investigadores de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Universidad Nacional Mayor de San Marcos estudien el material genético obtenido de su muestra por un largo período de tiempo, así como que la información genética derivada de dichos estudios sea colocada en bases de datos científicas en Internet.
- Estar de acuerdo en que su información personal dentro de posible (datos personales como su dirección, fecha de nacimiento, etc. con los cuales usted pudiera ser identificado) puedan ser corroborados con el Registro Nacional de Identidad y Estado Civil (RENIEC).

Su nombre y otros datos personales no serán divulgados y solo será de interés del proyecto y solo manejados por los investigadores que estudien las muestras y su material genético.

Si Usted considera que podría estar interesado en ser parte de este proyecto, por favor lea el resto de este documento y tome todo el tiempo que necesite para hacer preguntas.

La decisión de participar, o no, es completamente voluntaria y depende solamente de Usted.

¿Qué pasará con mi muestra?

Su muestra será guardada en el **Centro de Investigación en Biología Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga** para ser procesada y almacenada de manera que puedan ser utilizadas en estudios futuros en la misma línea de investigación. El laboratorio está ubicado en el Pabellón de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga en la Av. Independencia S/N en la ciudad de Ayacucho.

Su participación será confidencial. Los investigadores de este proyecto, tendrán que seguir todas las normas y leyes de ética vigentes que aplican para la investigación biomédica.

¿Cuáles son los beneficios de participar en el proyecto?

Probablemente usted no se beneficiará personalmente por participar en este proyecto porque este tipo de investigaciones normalmente requiere mucho tiempo para producir resultados médicamente útiles. Sin embargo, su participación ayudara a los investigadores de todo el mundo a entender más sobre la variación genética humana y su relación con la salud y la enfermedad. Cabe notar, que hasta la fecha no se ha obtenido el genoma completo de ningún peruano y por supuesto, de ningún nativo peruano. Los resultados del estudio de estos genes que obtengamos en este proyecto serán los primeros de nuestro país.

¿Cuáles son los riesgos de participar?

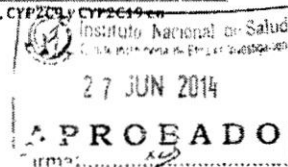
- La toma de la muestra de hisopado bucal; no representa un riesgo que el de cualquier estudio convencional de laboratorio. Este procedimiento médico es calificado por la ley como de riesgo mínimo.

¿Cómo protegerán mi privacidad?

Protegeremos su privacidad de diferentes maneras:

- Guardaremos su consentimiento informado en un archivo seguro; únicamente los miembros del grupo de trabajo de la UNSCH tendrán acceso a este archivo.
- No divulgaremos su nombre ni cualquier otra información de identificación (como su domicilio, fecha de nacimiento, etc.).
- Codificaremos su muestra de manera que nadie que no sea parte de nuestro equipo de investigación podrá identificar su muestra.

Título del Protocolo: "Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C19 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestizas de Ayacucho - Perú";
Fecha: 17/06/2014
Versión: Cuarta



Página 4

Carta de consentimiento informado individualizado.

- Debido a estas medidas, será extremadamente difícil para cualquier persona que consulte las bases de datos científicas poder saber si hay o no información de usted en las bases de datos científicas.

¿Cómo me puedo enterar de los resultados de la investigación?

Probablemente pasará 1 a 2 años hasta que la información derivada de este proyecto pueda ser utilizada para producir información relacionada con la salud y que sepamos cómo interpretarla exactamente. La devolución e información de resultados de los participantes, así como los hallazgos del estudio se realizará, dentro de tres meses después de la toma de muestras, en forma colectiva en presentaciones coordinadas previamente con los actores sociales y autoridades locales de los ámbitos donde se desarrolló este estudio.

Retiro del Estudio: La participación en este estudio es completamente voluntaria. Pueden negarse a participar o retirarse en cualquier momento que lo desee sin ninguna consecuencia para usted.

Información adicional: Usted es libre de realizar cualquier pregunta y pedir información en cualquier momento durante el estudio y tiene derecho a recibir respuestas que lo ayuden a entender y resolver sus dudas. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio puede comunicarse a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga con el Blogo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH Coordinador y Responsable del proyecto, al teléfono de la Facultad de Ciencias Biológicas 318553 o al celular 966909570. Si usted tiene cualquier pregunta concerniente a sus derechos como sujeto de este estudio de investigación, usted puede contactar al M.Sc. Blogo. Carlos Augusto YABAR VARGAS, Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud llamando al 748-0000 anexo 2179 en cualquier momento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por favor lea la siguiente información, medite su elección y firme si usted está de acuerdo:

Estoy de acuerdo:

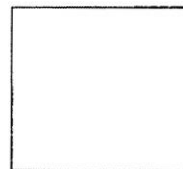
- En donar una muestra de hisopado bucal o gotas de sangre capilar;
- En que el ADN se utilice tanto en el estudio Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú como en otros estudios posteriores de variabilidad genética en poblaciones peruanas;
- En que toda la información genética de la muestra sea depositada en bases de datos científicas de acceso controlado (públicas) en Internet;
- En que la muestra o la información de la muestra podría ser estudiada por grupo de investigación sin fines de lucro.
- En que una vez que la muestra haya sido estudiada, no podré retirar la información de mi muestra de las bases de datos científicas.

He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente de que dar una muestra es mi decisión.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

Fecha _____

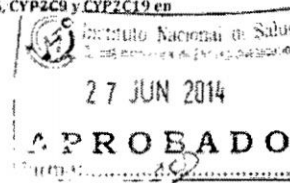


Huella digital

¿Se le otorgó copia al participante?: Si No

Nombre y firma del Investigador _____

Título del Protocolo "Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho - Perú".
Fecha: 17/06/2014
Versión: Cuarta



Página 5

Carta de consentimiento informado individualizado.

Anexo 4

Tabla 3. Detección del Gen *CYP2D6* y alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho – 2013.

N°	CÓDIGO DEL PACIENTE	TÉCNICA DE PCR		
		XL-PCR	ANIDADO	TETRAPRIMER
		Gen: <i>CYP2D6</i>	Alelos: <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*6</i>	Alelo: <i>CYP2D6*3</i>
1	CMA – H – F – 18 – 001	Presente	Presente	Ausente
2	CMA – H – M – 29 – 002	Presente	Presente	Presente
3	CMA – H – M – 54 – 003	Presente	Presente	Presente
4	CMA – H – M – 42 – 004	Presente	Presente	Presente
5	CMA – H – M – 38 – 005	Presente	Presente	Ausente
6	CMA – H – M – 42 – 006	Presente	Presente	Ausente
7	CMA – H – F – 56 – 007	Presente	Presente	Ausente
8	CMA – H – F – 23 – 008	Presente	Presente	Ausente
9	CMA – H – M – 49 – 009	Presente	Presente	Ausente
10	CMA – H – F – 28 – 010	Presente	Presente	Ausente
11	CMA – H – F – 73 – 011	Presente	Presente	Ausente
12	CMA – H – F – 26 – 012	Presente	Presente	Ausente
13	CMA – H – F – 36 – 013	Presente	Presente	Ausente
14	CMA – H – F – 72 – 014	Presente	Presente	Ausente
15	CMA – H – M – 22 – 015	Presente	Presente	Ausente
16	CMA – H – M – 44 – 016	Presente	Presente	Ausente
17	CMA – H – F – 33 – 017	Presente	Presente	Ausente
18	CMA – H – F – 57 – 018	Presente	Presente	Ausente
19	CMA – H – M – 19 – 019	Presente	Presente	Ausente
20	CMA – H – M – 66 – 020	Presente	Presente	Ausente

Anexo 5



Figura 13. Reactivos para extracción de ADN en Tarjetas FTA



Figura 14. Cabina pre-PCR, preparación del "mix" para XL – PCR.



Figura 15. Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjetas FTA

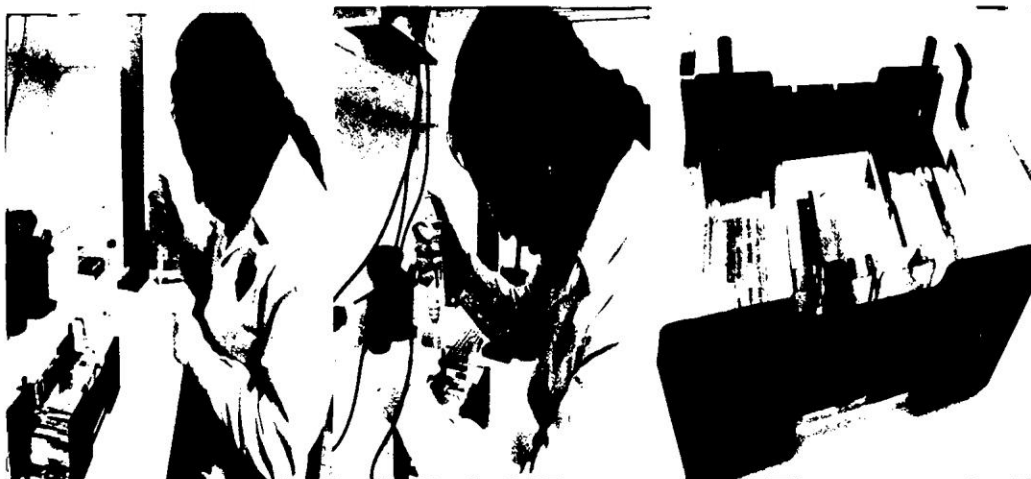


Figura 16. Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjetas FTA

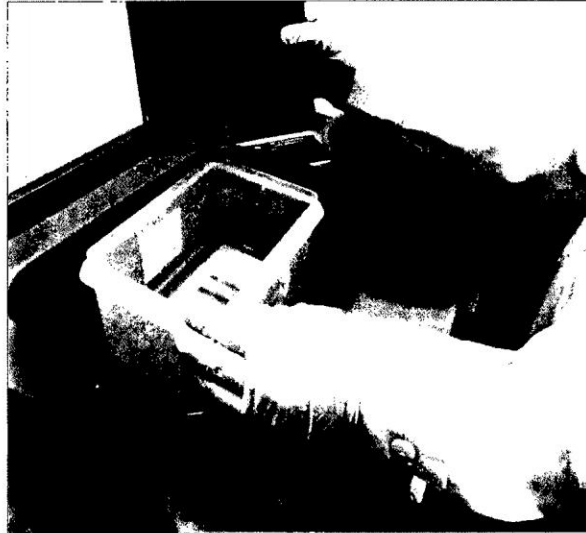


Figura 17. Coloración del gel de agarosa conteniendo los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjeta FTA, con bromuro de etidio al 1 %.



Figura 18. Sistema de registrador de imágenes Biometra *UV solo TS* del gel de agarosa con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjeta FTA, con bromuro de etidio al 1,5 %.

Anexo 6

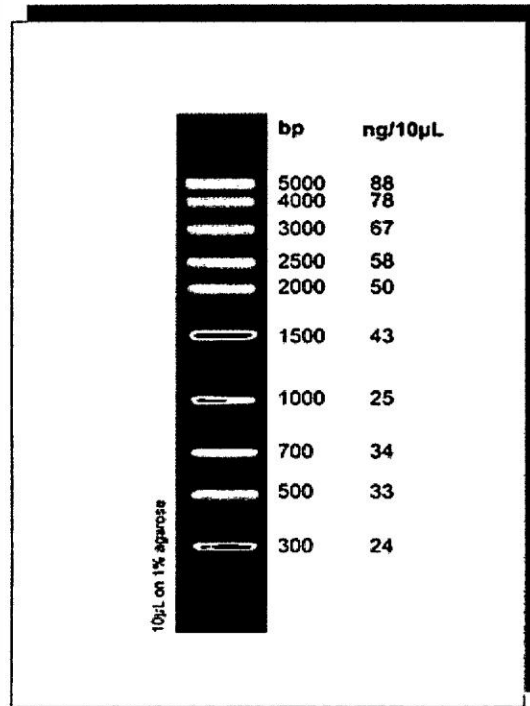


Figura 19. Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del "ladder 1 kb"

Anexo 7

Tabla 4. Estandarización para la amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR con 1, 2 y 3 punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(µL)	4 Rx(µL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	20,0
MgSO4	25 mM	1,5 mM	3,0	12,0
dNTP's	2.5 mM	0,2 mM	5,0	20,0
Primer Fw	10 uM	0,5 uM	2,5	10,0
Primer Rv	10 uM	0,5 uM	2,5	10,0
KOD polimerasa	1 U/UI	2,0 U	2,0	8,0
ADN molde			punch	Punch
H ₂ O PCR			30,0	120
TOTAL			50.0	200.0

Programa XL-PCR	Desnaturalización Inicial	95 °C x 5 min
	Desnaturalización	95 °C x 30 s
	35 Ciclos Hibridación	65 °C x 45 s
	Extensión	70 °C x 2 min
	Extensión Final	70 °C x 10 min
	Refrigeración	4 °C

Anexo 8

Tabla 5. Condiciones para la amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR con 3 punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(μ L)	6 Rx(μ L)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	30,0
MgSO ₄	25 mM	1,5 mM	3,0	18,0
dNTP's	2.5 mM	0,2mM	5,0	30,0
Primer Fw	10 μ M	0,5 μ M	2,5	15,0
Primer Rv	10 μ M	0,5 μ M	2,5	15,0
KOD polimerasa	1 U/UI	2,0 U	2,0	12,0
ADN molde			punch	03 punch
H ₂ O PCR			30,0	180
TOTAL			50.0	300.0

	Desnaturalización Inicial	95 °C x 5 min
	Desnaturalización	95 °C x 30 s
	35 Ciclos Hibridación	65 °C x 45 s
	Extensión	70 °C x 2 min
	Extensión Final	70 °C x 10 min
	Refrigeración	4 °C

Anexo 9

Tabla 6: Estandarización de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6* con volúmenes de 5µL y 10µL del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde.

Preparación del "mix" para la detección de los alelos <i>CYP2D6*4</i> Y <i>CYP2D6*6</i> del producto XL-PCR (amplicon)				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(µL)	3 Rx(µL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	15,0
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5	4,5
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1,0	3,0
Primer Fw*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	7,5
Primer Rv*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	7,5
<i>Platinum Taq</i> DNA polimerasa	1 U	0,2µL	0,2	0,6
ADN amplicón			05µL y 10µL	
H ₂ O PCR			32,3 y 27,3	
TOTAL			50,0	150,0

	Desnaturalización Inicial	95 °C x 5 min	
	Desnaturalización	94 °C x 30 s	
	35 Ciclos	Hibridación	56 °C x 10 s
		Extensión	72 °C x 1 min
	Extensión Final	70 °C x 5 min	
	Refrigeración	4 °C	

Anexo 10

Tabla 7: Condiciones de PCR anidado para la detección de los alelos CYP2D6*4 y CYP2D6*6 con 10 µL del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde.

Preparación del "mix" para la detección de los alelos CYP2D6*4 Y CYP2D6*6 del producto XL-PCR (amplicón)				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(µL)	8 Rx(µL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	40,0
MgCl ₂	50 Mm	1,5 mM	1,5	12,0
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1,0	8,0
Primer Fw*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	20,0
Primer Rv*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	20,0
Platinum Taq DNA polimerasa	1 U	0,2µL	0,2	1,6
ADN amplicón			10	80
H ₂ O PCR			27,3	218,4
TOTAL			50,0	400,0

	Desnaturalización Inicial	95 °C x 5 min	
	Desnaturalización	94 °C x 30 s	
	35 Ciclos	Hibridación	56 °C x 10 s
		Extensión	72 °C x 1 min
	Extensión Final	70 °C x 5 min	
Refrigeración	4 °C		

Anexo 11

Tabla 8: Estandarización de PCR tetraprimer para la detección del alelo CYP2D6*3 con punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.

Preparación del "mix" para la detección de los alelos CYP2D6*3 por PCR tetraprimer				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(µL)	8 Rx(µL)
PCR Buffer	10x	1x	2,5	20,0
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75	6,0
dNTP's	10 mM	0,4 mM	1,0	8,0
Primer *3	10 µM	0,12 µM	0,3	2,4
Primer *4 NEW	10 µM	0,12 µM	0,3	2,4
Primer *6	10 µM	0,3 µM	0,75	6,0
Primer AWT	10 µM	0,3 µM	0,75	6,0
KOD polimerasa	5 U/ µL	1,25 U	0,25	2,0
ADN			Punch	punch
H ₂ O PCR			18,4	147,2
TOTAL			25,0	200,0

Programa PCR tetraprimer	Desnaturalización	Inicial	95 °C x 2 min
	20 Ciclos	Desnaturalización	94 °C x 30 s
		Hibridación	63 °C x 30 s
	30 Ciclos	Extensión	72 °C x 1 min
		Desnaturalización	94 °C x 30 s
	30 Ciclos	Hibridación	53 °C x 30 s
		Extensión	72 °C x 1 min
Refrigeración			4 °C

Anexo 12
Tabla 9. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Perfil genético molecular del citocromo <i>CYP2D6</i> en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho - año 2013?	¿Cuál será el perfil genético molecular del citocromo <i>CYP2D6</i> en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho el año 2013?	<p>GENERAL</p> <p>Determinar el perfil genético molecular del citocromo <i>CYP2D6</i> en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho.</p> <p>ESPECIFICOS</p> <p>Estandarizar las técnicas de XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer, para amplificar el gen <i>CYP2D6</i>, a partir de muestras de sangre capilar impregnadas en tarjetas FTA.</p> <p>Detección de las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen <i>CYP2D6</i> de los pacientes en estudio.</p>	<p>Aspectos teóricos del citocromo <i>CYP2D6</i>, variantes alélicas y genotípicas.</p> <p>Tuberculosis</p> <p>Tratamiento antituberculosis.</p>	<p>El perfil genético molecular del citocromo <i>CYP2D6</i> en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, presenta variantes alélicas y genotípicas del gen <i>CYP2D6</i></p>	<p>Variable Principal:</p> <p>Pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho.</p> <p>Indicador:</p> <p>- Edad, sexo, grupo étnico.</p> <p>Variable secundaria:</p> <p>Perfil genético molecular del citocromo <i>CYP2D6</i>.</p> <p>Indicador:</p> <p>Detección de las variantes alélicas y genotípicas del gen <i>CYP2D6</i>.</p>	<p>Tipo de investigación :</p> <p>Básica – descriptivo.</p> <p>Nivel de investigación:</p> <p>Básico</p> <p>Definición de la población y muestra:</p> <p>Procedimiento para la recolección de muestra.</p> <p>Diseño Experimental:</p> <p>Extracción de ADN humano de sangre capilar.</p> <p>Se amplificará mediante XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer.</p>

Perfil genético molecular del citocromo CYP2D6 en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho - 2013.

Marleny Vera Meza¹, Tomás Miranda Tomasevich¹ y Aldo Tinco Jayo¹.

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo humano; participa en la oxidación de más del 20% de las drogas de uso clínico, se expresa de forma muy variable, dependiendo del grupo étnico.

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre de 2013 a Junio de 2014 en la ciudad de Ayacucho – Perú, y como objetivos: determinar el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho; estandarizar las técnicas de XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer; y detectar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de estos pacientes. La muestra estuvo conformada por 20 pacientes. Se determinaron las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción XL-PCR para amplificar un fragmento del gen *CYP2D6*, utilizando como ADN molde tres “punch” de tarjeta FTA, hibridación a 65 °C por 45 s. Las condiciones de PCR anidado, para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*; con ADN molde (amplicón del XL-PCR) 10 µL; hibridación a 56 °C por 10 s. Las condiciones de PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*3*, con tres “punchs” conteniendo ADN de sangre capilar (molde), 20 ciclos con hibridación a 63°C por 30 s y luego 30 ciclos con hibridación a 53°C por 30s. Concluyendo que el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* de los 20 pacientes en estudio, corresponde a las siguientes variantes alélicas: 17 pacientes *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 y tres pacientes con *1/*3; es decir todos presentan genotipos heterocigotos, por tanto todos tienen al menos un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal.

Palabra clave: gen *CYP2D6*, XL-PCR *CYP2D6*, farmacogenética *CYP2D6*.

SUMMARY

The cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*), is one of more important enzymes involved in the metabolism of the xenobiotics in the human body; it takes part in the oxidation of more than 20 % of the drugs of clinical use, expresses of very variable form, depending on the ethnic group. It was realized in the Center of Investigation in Molecular Biology and Bioinformática of the Faculty of Biological Sciences of the National University of san Cristobal of Huamanga, during October, 2013 to June, 2014 in Ayacucho's city - Peru, and as aims: to determine the genetic molecular profile of the cytochrome *CYP2D6* in patients with tuberculosis attended in Ayacucho's Regional Hospital; to standardize the technologies of XL-PCR, sheltered PCR and PCR tetraprimer; and the variants detect alélicas *1, *3, *4 y *6 of the gene *CYP2D6* of these patients. The sample was shaped by 20 patients. There decided the physical and chemical conditions of the components of the reaction XL-PCR to amplify a fragment of the gene *CYP2D6*, using as DNA mold three "punch" of card FTA, hybridization to 65 °C for 45 s. The conditions of sheltered PCR, for the detection of the alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* and *CYP2D6*6*; with DNA mold (amplicón of the XL-PCR) 10 µL; hybridization to 56 °C for 10 s. The conditions of PCR tetraprimer for the detection of the alelo *CYP2D6*3*, with three "punchs" containing DNA of capillary blood (mold), 20 cycles with hybridization to 63°C for 30 s and then 30 cycles with hybridization to 53°C for 30s. Concluding that the genetic molecular profile of the cytochrome *CYP2D6* of 20 patients in study, It corresponds to the following variants alélicas: 17 patients *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 and three patients with *1/*3; it is to say all they present genotypes heterocigotos, therefore they all have at least an alelo *1 wild, whose phenotype corresponds to the enzymatical normal activity.

Key word: gene *CYP2D6*, XL-PCR *CYP2D6*, farmacogenética *CYP2D6*.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis*, es la segunda causa de mortalidad por un agente infeccioso en el mundo, luego del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), determinando 1,8 millones de muertes por año. Noventa y ocho por ciento de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo como Perú.¹

El tratamiento se basa en diversos regímenes de terapia combinada (varios medicamentos) de corta duración formulados en los decenios de 1970 y 1980, y que han ido mejorando en el transcurso de los años, teniendo en cuenta tres propiedades fundamentales de los medicamentos antituberculosos: capacidad bactericida, capacidad esterilizante y capacidad de prevenir la resistencia. La isoniazida y la rifampicina son considerados como el núcleo básico del tratamiento antituberculoso, a la que se agregó posteriormente la pirazinamida; todas ellas pueden eliminar el bacilo de la TB (*Mycobacterium tuberculosis*) en cualquier localización, a nivel intracelular y extracelular.² El citocromo P450 2D6 (CYP2D6), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo. Participa en la oxidación de más de un 20% de las drogas de uso clínico, se expresa en el hígado, en el intestino y en el cerebro de forma muy variable.³ La actividad del CYP2D6 es extremadamente variable debido a la existencia de un gran número de variantes alélicas que definen cuatro niveles principales de actividad (fenotipos): metabolizadores ultrarrápidos (MUR), presentan actividad aumentada, metabolizadores rápidos (MR) individuos que tienen actividad normal, metabolizadores intermedios (MI) con actividad disminuida susceptibles a la inhibición por otros medicamentos, y metabolizadores lentos (ML), que son los individuos con actividad pobre o ausente del gen.⁴ El Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, cuenta con el proyecto de investigación regional: Caracterización molecular y frecuencias alélicas de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9* y *CYP2C19* en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú, y considerando que esta población es

vulnerable a muchas enfermedades infecciosas como la tuberculosis, atribuibles a la pobreza, acceso limitado a servicios de salud y alta prevalencia de infección por VIH, formulamos el presente trabajo como parte del citado estudio, que se desarrolló durante los meses de octubre de 2013 a Junio de 2014 en la ciudad de Ayacucho. Planteándonos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* en pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar las técnicas de XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer, para amplificar el gen *CYP2D6*, a partir de muestras de sangre capilar impregnadas en tarjetas FTA.
- Detectar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de los pacientes en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Constituido por todos los pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el año 2013.

Muestra: Conformada por 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el periodo de ejecución del presente estudio, éstas fueron recolectadas en base a los criterios de inclusión. El material biológico fue sangre capilar impregnada en tarjetas FTA.

Tipo de muestreo

Muestreo por conveniencia.

Unidad muestral

ADN humano de sangre capilar.

DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Se llenó la ficha de datos de los pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho durante el año 2013, que voluntariamente aceptaron participar en el presente estudio, firmando la carta de consentimiento informado.

Se obtuvo la muestra, aplicando una punción en la yema del dedo dejando caer unas gotas de sangre capilar en una tarjeta de conservación de ADN (FTATM Classic Card Whatman) previamente rotulada con el

código de la persona muestreada, la codificación en la tarjeta FTA se asignó de acuerdo al siguiente formato: comunidad mestiza Ayacucho – Inicial del distrito – sexo – edad – y número correlativo de la toma de muestra.

Ejemplo: CMA – H – M – 35 – 001

Leyenda:

CMA: Comunidad Mestiza Ayacucho

H: Huamanga

M: Sexo

35: Edad en años

001: Número correlativo de la muestra.

Ésta tarjeta se mantuvo conservada en una caja térmica, para su transporte al laboratorio y posterior procesamiento.

Obtención de ADN a partir de sangre capilar en tarjeta FTA.

Se procedió con los pasos descritos en el protocolo para el kit de extracción de ADN: WB120204 Whatman™ FTA Purification Reagent, luego fueron guardadas a -70 °C por criopreservación.

PROCEDIMIENTO:

- Se desinfectó el pulpejo del dedo del paciente con algodón embebido en alcohol, se dejó evaporar y se aplicó una punción con la ayuda de una lanceta estéril.
- Las gotas de sangre capilar se dejaron caer sobre la superficie circular indicada en las tarjetas de FTA GeneCard, se secó al medio ambiente durante 1 hora o toda la noche.
- Usando el perforador micro punch TM de 1.2 mm, se removió la muestra impregnada en la tarjeta FTA, colocando éste fragmento (punch) en un tubo eppendorf de 1.5 ml (tres punch por tubo).
- Se adicionó 200 ul de la solución de purificación FTA, para tres punch por tubo, se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, se agitó dos veces suavemente en vórtex.
- Utilizando una micropipeta se desechó todo el reactivo posible, de ser necesario se utilizó papel secante.
- Se repitió los pasos 4 y 5, tres veces o más, hasta que los punches queden de color blanco.
- Luego se adicionó 200 ul de buffer TE 1X, se dejó incubar 5 min. a temperatura ambiente y se agitó suavemente en la mano dos o más veces.
- Utilizando la micropipeta se desechó todo el buffer TE 1X.
- Se repitió los pasos 7 y 8, tres veces o más.

- Se dejó secar los punch, de ser necesario utilizando papel secante.

- Las muestras de ADN extraídas mediante la solución de purificación de FTA no requieren cuantificación.

Estandarización de XL-PCR para la amplificación de fragmento del gen CYP2D6, con 1, 2 y 3 punch de tarjeta FTA que contiene ADN molde impregnado.

La fórmula del “mix” para una reacción con un volumen final de 50 µL, se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO₄ 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw (forward) 5’CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA3’ 0,5 µM, primer Rv (reverse) 5’GGCTGGGTCCCAGGTCATAC3’ 0,5 µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 2,0 U, número de punch conteniendo ADN de sangre capilar (1, 2 y 3 punch por tubo N° 1, N° 2 y N° 3 respectivamente).

Se colocaron los tubos en el termociclador y programó el equipo con las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 45 s y 70 °C por 2 min, seguidos por 10 min a 70 °C para la extensión final.

Para la detección de los productos del XL-PCR de 2 900 pb, fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % a 60 voltios durante 90 minutos, estos geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio al 1 % y dos enjuagues suaves con agua corriente, los productos del XL-PCR se observaron por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, y adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de ADN.

Estandarización de PCR anidado para la detección de los alelos CYP2D6*1, CYP2D6*4 y CYP2D6*6, a partir del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde con volúmenes de 5 µL y 10 µL.

La fórmula del “mix” para una reacción con un volumen final de 50 µL, se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2mM, primer Fw 5’CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAACAAG3’ 0,5µM, primer Rv 5’GAGACTCCTCGGTCTCTCG3’ 0,5

μM y Taq ADN polimerasa 1 U, el ADN molde fue el amplicón (producto del XL-PCR) y se trabajó con los volúmenes de 5 μL y 10 μL para cada tubo respectivamente. Se colocaron los tubos en el termociclador y programó el equipo con las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 10 s y 72°C por 1 min, seguidos por 5 min a 70 °C para la extensión final.

Los productos del XL-PCR anidado con cada una de las condiciones físicas y químicas ensayadas, presentes en los geles de agarosa al 3 % se tiñeron con bromuro de etidio al 1 % y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se observaron por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega píxeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de los productos de amplificación de ADN.

Estandarización de PCR tetraprimer para la detección del alelo CYP2D6*3, con punch de tarjeta FTA que contiene ADN molde impregnado.

La fórmula del "mix" para una reacción con un volumen final de 25 μL, se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,4 mM, primer CYP2D6*3-3 5'GCGGAGCGAGAGACCGAGGA3' 0,12μM, CYP2D6*3-4 *new* 5'GGTCCGGCCCTGACACTCCTTC3' 0,12μM, CYP2D6*3-6 5'GCTAACTGAGCACG3' 0,3 μM, CYP2D6*3-*awt* 5'TCCCAGGTCATCCT3' 0,3 μM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,25 U, tres punches conteniendo ADN de sangre capilar, para cada tubo. Se colocaron los tubos en el termociclador y programando el equipo con los datos planteados para cada caso, se puso en marcha la replicación de los fragmentos de ADN.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 63°C por 30 s y 72 °C por 1 min, y luego 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 53°C por 30 s 72 °C por 1 min.

Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos de los geles de agarosa conteniendo los productos de amplificación de los fragmentos del gen CYP2D6, por XL-PCR, PCR anidado y PCR tetraprimer, para la detección de los alelos CYP2D6*1, CYP2D6*4, CYP2D6*6 y CYP2D6*3, respectivamente.

RESULTADOS

Tabla 1. Detección del Gen CYP2D6, alelos: CYP2D6*1, CYP2D6*4, CYP2D6*6 y CYP2D6*3, y genotipos; mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho – 2013.

	TÉCNICA DE PCR			
	XL-PCR	ANIDADO	TETRAPRIMER	
DETECCIÓN DE GEN Y ALELO EN PACIENTES CON TBC Gen: CYP2D6	Alelos			
	:			
	CYP2D6*1, CYP2D6*4, CYP2D6*6		Alelo: CYP2D6*3	
	<hr/>			
	Genotipo: *1/*1, *1/*4, *1/*6.		Genotipo: *1/*3	
	Presente	20	17	3
	Ausente	0	3	17
	TOTAL	20	20	20

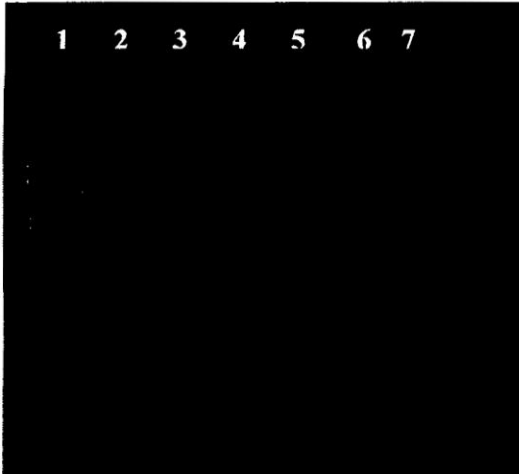


Figura 1: Productos de la amplificación de fragmento de 2 900 pb del gen *CYP2D6* mediante XL-PCR con 1, 2 y 3 “punch” de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA, en gel de agarosa al 1,5 %. carril 1 con *ladder* 1Kb, carril 2 con un “punch” carril 3 con dos “punch”, carril 4 con tres “punch”, carril 5 con blanco, carril 6 con el control, carril 7 con ADN Genómico.

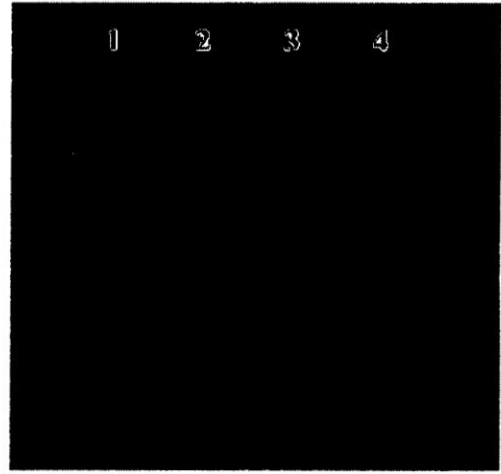


Figura 3: Productos de amplificación de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, con diferentes volúmenes del producto XL – PCR (amplicón) como ADN molde, en gel de agarosa al 3 %, carril 1 con *ladder* 1Kb, carril 2 con 05 µL del amplicón, carril 3 con 10 µL del amplicón, carril 4 con blanco.

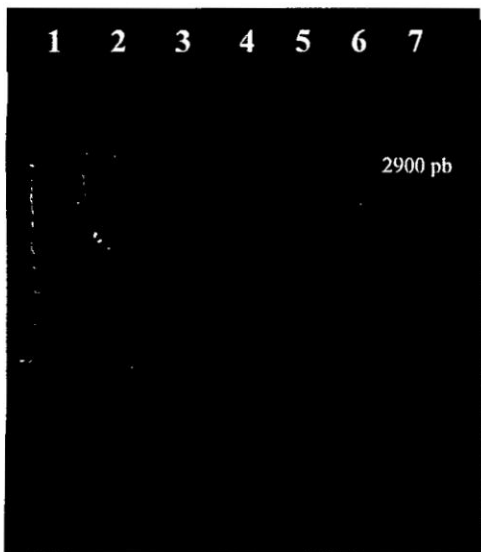


Figura 2: Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de cinco pacientes, mediante XL-PCR con tres “punch” de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5 %.

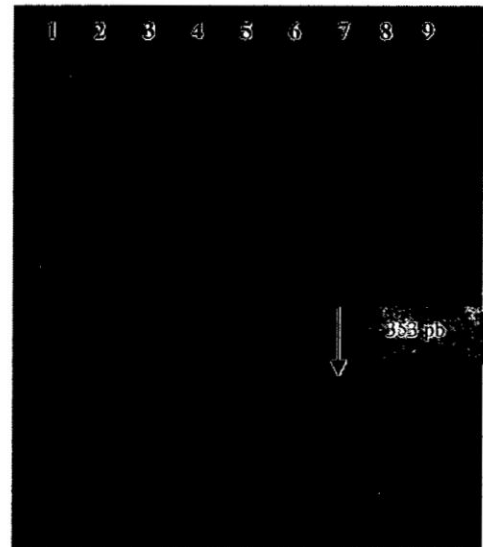


Figura 4: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en agarosa al 3 %.

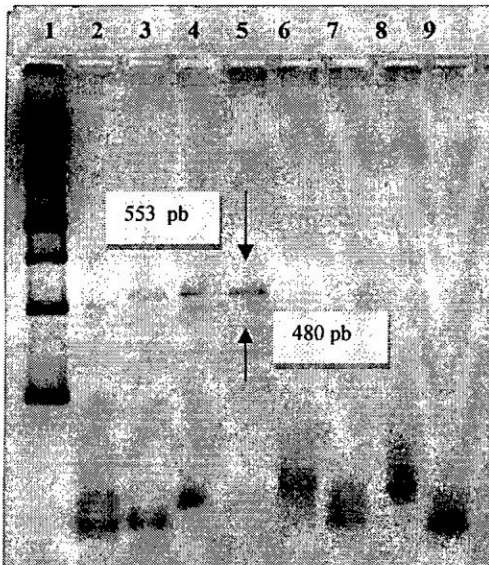


Figura 5: Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3 %.

DISCUSIÓN

Los productos de amplificación de segmentos de ADN correspondiente al gen *CYP2D6*, por medio de las diferentes técnicas variantes de PCR, se corrieron en gel de agarosa y se tomaron los registros fotográficos, para la interpretación respectiva que se detalla a continuación.

La tabla 1 representa los resultados de la detección del Gen *CYP2D6*, alelos: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*6* y *CYP2D6*3*, y genotipos; obtenidos mediante las técnicas variantes de PCR, de 20 pacientes con tuberculosis atendidos en el Hospital Regional de Ayacucho, durante el periodo de ejecución del presente estudio, a partir de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.

El gen *CYP2D6* fue detectado mediante la técnica de XL-PCR, cuyos primers amplificaron un fragmento de 2 900 pb, determinando la presencia del gen en los 20 pacientes, la eficiencia de los componentes del "mix" y programación de las condiciones de amplificación, consecuentemente la obtención del amplicón, que sirvió como ADN molde para la siguiente técnica de PCR anidado, utilizándose otros dos primers, para secuencias de nucleótidos internos del amplicón, que permitieron amplificar un fragmento de 353 pb, en 17 de

los 20 pacientes, que indica la presencia de alelos: *1, *4 ó *6, cuya discriminación se realizaría con una digestión enzimática utilizando nucleasa BstNI (que lamentablemente no se pudo adquirir porque no existe en el mercado nacional).

La detección de éste fragmento, nos permite deducir que el genotipo de cada una de las 17 personas, estaría incluida dentro de las tres posibilidades: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6, es decir heterocigotos. Todos tienen al menos un alelo *1 que es el silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal; y cabe la posibilidad que el otro alelo de cada uno de ellos pueda ser: *1 alelo silvestre con metabolismo normal, *4 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica, y *6 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica.

La probabilidad de hallar variantes alélicas *1/*4 ó *1/*6, luego de la digestión enzimática para la respectiva identificación de los productos de la amplificación con PCR anidado, estaría relacionados con los estudios realizados por Grimán,⁵ Alanis,⁶ Heras⁷ y Bañuelos⁸, que mencionamos a continuación:

Grimán⁵, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centrooccidental de Venezuela, teniendo como resultado el alelo más frecuente *CYP2D6*4* con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas.

Alanis⁶, realizó estudios del polimorfismo gen *CYP2D6* en menonitas mexicanas de origen caucásico del estado de Durango México, determinando las frecuencias de las variantes alélicas *CYP2D6*4*, *6 y *10.

Heras⁷, Realizó estudios en pobladores sanos del Ecuador, acerca de la identificación del polimorfismo de un solo nucleótido en el gen *CYP2D6* del citocromo P450, comprobándose que la frecuencia de alelos *4 (8,5%) y *5 (2,2%) es similar a la reportada en estudios en población caucásica y mestizos hispanos obteniendo como resultado la existencia de polimorfismos genéticos de *CYP2D6* en la población ecuatoriana.

En México el estudio realizado por Bañuelos⁸, sobre las frecuencias de las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en Menonitas, resultaron ser con mayor frecuencia los alelos *4 y *10, los cuales fueron similares a las reportadas en los caucásicos.

El PCR tetraprimer fue procesado con ADN genómico de sangre capilar impregnada en el punch de la tarjeta FTA, de cada uno de los 20 pacientes que ingresaron al estudio, que sirvió como ADN molde para cuatro primers con diana en las secuencias internas del gen *CYP2D6*, detectándose en tres de los 20 pacientes, dos bandas de productos de amplificación de 553 pb y 480 pb que corresponde a los alelos *1 y *3, respectivamente.

Al visualizarse las dos bandas en cada una de las muestras de los tres pacientes nos revela que el genotipo es heterocigoto *1/*3, con un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal, y *3 alelo mutante con ausencia total de actividad metabólica.

Los resultados obtenidos, en la detección de tres casos de pacientes heterocigotos *1/*3, coinciden con lo planteado por Sachse⁹, que existe alrededor de 20 polimorfismos con el fenotipo MP, de los cuales aproximadamente el 95% corresponden a los alelos *3, *4, *5 y *6, en individuos caucásicos, siendo el alelo con mayor frecuencia el *4, seguido de la variante *3 y la variante *6.

Así mismo Grimán⁵, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centrooccidental de Venezuela, en la que no detectó ningún caso de variantes *CYP2D6**3.

La figura 1 representa el primer ensayo realizado para la estandarización de XL-PCR del gen *CYP2D6*, tomando como ADN molde, el ADN extraído de sangre capilar que se encontraba impregnada en la tarjeta FTA, de la cual se obtuvieron discos de 2 mm de diámetro a los que le denominamos "punch"; el carril 1, corresponde al marcador de tamaño molecular "ladder" de 1 Kb, los carriles 2, 3 y 4 contiene el ADN molde en los "punch", con uno, dos y tres "punch" respectivamente, muestra los productos de la amplificación en bandas definidas directamente relacionado al número de "punch", revelando que para el XL-PCR es necesario incorporar al tubo del "mix" tres punch por paciente, puesto que el producto amplificado es bastante grande de aproximadamente 2 900 pb. El carril 5 no manifiesta ningún producto de la reacción, es el "blanco" sin "ADN molde", solo contiene el "mix" indicándonos que no hay contaminación ni reacciones cruzadas; el carril 6 muestra una banda definida de 2 900 pb, es el "control" que se amplificó con ADN molde extraído de linfocitos humanos

mediante extracción orgánica; el carril 7 contiene solo el ADN genómico extraído de linfocitos humanos.

Las figura 2, muestra los productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de cinco pacientes del total de 20 pacientes que contiene el presente trabajo, mediante XL-PCR con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar por cada paciente, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5%. Los resultados revelan que el fragmento del gen *CYP2D6* ha sido amplificado en la totalidad de los pacientes que ingresaron en estudio, que nos permitirá continuar con la siguiente etapa de PCR anidado, puesto que éste producto (amplicón) será utilizado como ADN molde.

La figura 3 revela los productos de amplificación de PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6**4 y *CYP2D6**6, con diferentes volúmenes del producto XL-PCR (amplicón) como ADN molde, en gel de agarosa al 3,0%; como se puede apreciar las bandas del producto del PCR anidado, son más intensas con 10µL de ADN molde (carril 3) que con 5µL del carril 2, correlacionando con el ladder del carril 1 y contrastando con el "blanco" del carril 4; por tanto resulta una mejor reacción, cuando se procesa con el volumen de 10µL de ADN molde (amplicón).

Las figuras 4 muestra los productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de los 7 pacientes, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6**1 (silvestre) y alelos mutantes *CYP2D6**4 y *CYP2D6**6, en gel de agarosa al 3,0%, utilizando como ADN molde el amplicón del XL-PCR del gen *CYP2D6*; Los resultados se obtuvo en la totalidad de pacientes (20), reflejando que todos los pacientes en estudio muestran al menos un alelo silvestre y/o heterocigoto, que corresponde a: silvestre/silvestre, silvestre/*4 y silvestre/*6.

La figura 5, representa los productos de amplificación de 553 pb y 480 pb, del fragmento del gen *CYP2D6* de siete pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6**3, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3,0%. Los carriles 3, 4 y 5 corresponde a los pacientes que presentan un alelo silvestre y otro mutante *3, constituyendo personas heterocigotas para el gen *CYP2D6*, los carriles 2, 6, 7 y 8

son pacientes que no presentan alelos mutantes *3, el carril 1 es del ladder y el carril 9 del blanco.

Los 17 pacientes restantes no muestran los productos de amplificación de 553 pb y 480 pb, del fragmento del gen *CYP2D6*; mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6**3, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 3,0%.

Se concluye que el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* de los 20 pacientes en estudio, corresponde a las siguientes variantes alélicas: 17 pacientes *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 y tres pacientes con *1/*3; es decir todos presentan genotipos heterocigotos, por tanto todos tienen al menos un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization. Health situation in the Americas, Basic Indicators. 2005. www.paho.org. (accedido en septiembre 2006).
2. Ministerio de Salud del Perú (MINSA). Tuberculosis en el Perú. Informe 2000. Dirección General de Salud de las Personas, Programa Nacional de Control de Enfermedades Transmisibles/Control de la Tuberculosis. Lima. 2000.
3. Ding X , Kaminsky L. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. Annu.2003.
4. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004.
5. Griman P, Moran Y, Camargo M y Chiurillo M. Caracterización de variantes alélicas de citocromo *CYP2D6* en la población de la región centroccidental de Venezuela. 2009.[revista en internet].2009 [acceso Enero de 2009] Disponible en: www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/download/.../10311
6. Alanis R, Lares I, Sosa M ,Alvarez F, y Lazalde B. Polimorfismo del *CYP2D6* en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México.[revista en internet]. 2007 [acceso Abril de 2014] Disponible: en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=101&IDARTICULO=18745&IDPUBLICACION=1918>
7. Heras G. Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen *CYP2D6* del citocromo P450, en población sana del Ecuador. 2010.
8. Bañuelos A, Lares A, Sosa M, Bradley A, Lazalde R. Polimorfismo del *CYP2D6* en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México. [revista en internet]. 2007. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://www.redalyc.org/pdf/142/14290204.pdf>