

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Fenotipos metabolizadores del gen *CYP2D6* de
pacientes esquizofrénicos en tratamiento con fármacos
antipsicóticos. Ayacucho, 2017

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

Bach. ORTIZ HUAUYA, Leydy Yuliett

AYACUCHO - PERÚ

2017

A mis padres Pedro Ortiz y Epifania Huauya, por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica y a mi hijo Adriano por ser mi fortaleza e inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a nuestra Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga *Alma Mater* forjador de excelentes profesionales al servicio de la humanidad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias a lo largo de mi formación académica, para prepararnos para un futuro más competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas.

A mis asesores el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Dr. Aldo Tinco Jayo, quienes accedieron a brindarme todo su apoyo, conocimiento y experiencia científica.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General:	2
Objetivos Específicos:	2
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes del estudio.	3
2.2 Marco conceptual	5
2.2.1 Esquizofrenia	5
2.2.1.1 La esquizofrenia	5
2.2.1.2 Tratamiento de la Esquizofrenia	5
2.2.1.3 Medicamentos antipsicóticos.	5
2.2.2 Gen <i>CYP2D6</i>	6
2.2.2.1 Variabilidad genotípica y fenotípica	7
2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	8
2.4. Variantes de PCR	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Ubicación del trabajo de investigación	15
3.2 Población y muestra	15
3.2.1 Población	15
3.2.2 Muestra	15
3.2.3 Muestreo	15
3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos	15
3.3.1. Recolección de la muestra	15
3.3.2. Obtención de ADN a partir de sangre capilar en tarjeta FTA.	16
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
3.4.1. XL-PCR para la amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> .	17

3.4.2 PCR anidado para la detección de los alelos <i>CYP2D6*1</i> , <i>CYP2D6*4</i> y <i>CYP2D6*6</i> ,	17
3.4.3 PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*3</i> .	18
3.5 Interpretación de resultados	18
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSION	23
VI. CONCLUSIONES	27
VII. RECOMENDACIONES	29
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Actividad enzimática de los diferentes alelos del <i>CYP2D6</i> .	7
Tabla 2	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, de 20 pacientes esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".	19
Tabla 3	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 esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".	40
Tabla 4	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.	45
Tabla 5	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.	46
Tabla 6	Condiciones de PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*3</i> con punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	11
Figura 2	Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de pacientes esquizofrénicos, mediante XL-PCR con tres“punch” de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5%.	20
Figura 3	Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de pacientes esquizofrénicos, 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 2.5%..	21
Figura 4	Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen <i>CYP2D6</i> de 20 pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*1</i> y <i>CYP2D6*3</i> , con tres “punch” de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 2.5 %.	22
Figura 5	Reactivos para extracción de ADN en Tarjetas FTA	41
Figura 6	Cabina pre-PCR, preparación del “mix” para XL – PCR..	41
Figura 7	Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA.	42
Figura 8	Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA	42
Figura 9	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 %.	43
Figura 10	Sistema de registrador de imágenes Biometra UV solo TS 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%.	43
Figura 11	Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del “ladder 1 kb”	43

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
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.	35
Anexo 2	Extracción de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA	36
Anexo 3	Carta de consentimiento informado individualizado	37
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 esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".	40
Anexo 5	Fotografías	41
	Reactivos para extracción de ADN en Tarjetas FTA Cabina pre-PCR, preparación del "mix" para XL – PCR	41
	Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA	42
	Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN capilar en tarjetas FTA	42
	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 %.	43
	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 %.	43
Anexo 6	Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del "ladder 1 kb"	44
Anexo 7	Condiciones para la amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> .	45
Anexo 8	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 (amplión) como ADN molde.	46
Anexo 9	Condiciones de PCR tetraprimer para la detección del alelo <i>CYP2D6*3</i> con punch de ADN de sangre capilar en tarjetas FTA.	47
Anexo 10	Matriz de Consistencia	48

RESUMEN

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales más importantes desde el punto de vista de la salud pública, no solo por la cantidad de individuos a los que afecta, sino también por la severidad y cronicidad de sus síntomas, el estigma que la rodea, los trastornos familiares y sociales que se producen. La actividad del CYP2D6 es extremadamente variable debido a la existencia de un gran número de variantes alélicas que definen cuatro niveles principales de fenotipos metabolizadores. Los objetivos planteados fueron describir los fenotipos metabolizadores del gen *CYP2D6* de pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA" e identificar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6*, mediante la técnica de PCR-XL, PCR-anidado y PCR-tetraprimer.

La muestra estuvo conformada por 20 pacientes que firmaron su consentimiento informado. Se programó las condiciones físicas y químicas para la reacción XL-PCR y amplificar un fragmento del gen *CYP2D6*, utilizando como ADN molde de cada paciente el contenido en tres "punch" de tarjeta FTA, la hibridación fue a 65°C por 45s. Las condiciones de PCR anidado, para la detección de los alelos *CYP2D6**1, *CYP2D6**4 y *CYP2D6**6 usó como ADN molde el amplicón del XL-PCR en volumen de 10 µL, la hibridación fue a 56 °C por 10 s. Las condiciones de PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6**3 fue con tres "punchs" conteniendo ADN de sangre capilar como molde, 20 ciclos con hibridación a 63°C por 30 s y luego 30 ciclos con hibridación a 53°C por 30s.

Se concluye que el perfil genético molecular del citocromo *CYP2D6* de los 20 pacientes en estudio, corresponde a las siguientes variantes alélicas: 18 pacientes *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6 y dos pacientes con *1/*3; es decir todos los pacientes presentan genotipos heterocigotos, excepto*1/*1, por tanto todos tienen al menos un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo metabolizador corresponde a la actividad enzimática normal.

Palabras claves: gen *CYP2D6*, XL-PCR *CYP2D6*, farmacogenética *CYP2D6*

I. INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales más importantes desde el punto de vista de la salud pública, no solo por la cantidad de individuos a los que afecta, sino también por la severidad y cronicidad de sus síntomas, el estigma que la rodea, los trastornos familiares y sociales que se producen. El tratamiento farmacológico ha supuesto uno de los grandes cambios en el pronóstico de esta enfermedad. Los pacientes en tratamiento farmacológico con antipsicóticos, mejoran su calidad de vida y disminuyen el número de recaídas.

La introducción de antipsicóticos de nueva generación (atípicos) parece presentar como ventaja frente a los clásicos (típicos) una mayor eficacia y un menor número de efectos adversos. Uno de los problemas relacionados con el tratamiento de la esquizofrenia es la existencia de una gran variabilidad en la respuesta a los fármacos antipsicóticos. Ésta puede explicarse por la variación interindividual en su metabolismo debido a la implicación de enzimas (citocromo P450) con polimorfismo genético, entre ellas el *CYP2D6* parece ser el citocromo más relevante en el metabolismo de fármacos antipsicóticos, que es base del tratamiento de la esquizofrenia. 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.

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 enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, formulamos el presente trabajo como parte del citado estudio, que se desarrolló durante los meses de julio del 2017 a setiembre de 2017 en la ciudad de Ayacucho, planteándonos los siguientes objetivos:

Objetivo General

Describir los fenotipos metabolizadores del gen *CYP2D6* de pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".

Objetivos Específicos:

Identificar las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6*, mediante la técnica de PCR-XL, PCR-anidado y PCR-tetraprimer.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Según la Organización Mundial de la Salud define a la esquizofrenia como una enfermedad mental, o grupo de enfermedades de causas todavía desconocidas, caracterizada por trastornos del pensamiento, de la percepción, de la afectividad y del comportamiento social¹. Según la OMS, la incidencia anual media de la esquizofrenia, 10 a 15 casos por 100.000 habitantes mientras que la prevalencia de esta enfermedad es de cerca del 1%, es relativamente elevada si se compara con su incidencia debido a su carácter crónico. Aunque la esquizofrenia sea un trastorno que puede comenzar en cualquier edad (tanto en la infancia como en la madurez), entre el 20 y el 40% de los pacientes experimentan los primeros síntomas psicóticos antes de los 20 años, siendo la incidencia máxima de los hombres entre los 15 y los 25 años y en las mujeres entre los 25 y los 35 años.¹

En el ser humano, las enzimas codificadas por los genes *CYP450* se encuentra 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*.²

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.³

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 caucásicos⁴, 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.⁴

Brosen K y Gram LF, fueron los primeros en clarificar las condiciones clínicas para la aplicación de la fenotipación CYP2D6 como una herramienta terapéutica y señalaron que la psiquiatría podría beneficiarse de la aplicación clínica de la evaluación de *CYP2D6*.

Para optimizar la terapia farmacológica los especialistas deberían determinar la capacidad metabólica de los pacientes.⁵

Grimán, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centro occidental de Venezuela, teniendo como resultado el alelo más frecuente *CYP2D6**4 con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas.⁶

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 *10.⁷

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.⁸

En México el estudio realizado por Bañuelos, sobre las frecuencias de las variantes 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.⁹

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 antidepresivo.¹⁰

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.¹¹

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

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Esquizofrenia

2.2.1.1 La esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad mental de carácter crónico que no afecta por igual a todos los pacientes. La sintomatología de la esquizofrenia se suele dividir en síntomas positivos (alucinaciones, delirios, conductas extravagantes, etc.) y síntomas negativos (alogia, falta de emotividad y afectos, etc.), que configuran cuadros altamente variables entre los pacientes.¹

2.2.1.2 Tratamiento de la Esquizofrenia

El tratamiento de la esquizofrenia resulta de la combinación de la terapia farmacológica y los tratamientos psicosociales, entre los que se incluye la terapia familiar, la psicoeducación y la implicación de un equipo multidisciplinar de profesionales sanitarios. El tratamiento farmacológico de los pacientes se basa en la utilización de fármacos antipsicóticos este ha supuesto uno de los grandes cambios en el pronóstico de esta enfermedad. Los pacientes en tratamiento farmacológico con antipsicóticos, mejoran su calidad de vida y disminuyen el número de recaídas.¹²

Las terapias farmacológicas están frecuentemente asociadas con grandes diferencias inter e intraindividuales en la respuesta terapéutica. Estas diferencias se deben en parte a la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los fármacos y sus metabolitos.¹³

2.2.1.3 Medicamentos antipsicóticos.

Antipsicóticos típicos, estos fármacos se introdujeron en su mayoría durante las décadas de los años mil novecientos cincuenta y setenta. Se incluyen aquí los compuestos siguientes: amisulprida, clorpromazina, flufenazina, haloperidol, levomepromazina, loxapina, perfenazina, periciazina, pimozida, pipotiazina, sulpirida, tiaprida, tioproperazina, trifluoperazina y zuclopentixol. La mayor parte de ellos son útiles en el tratamiento del brote psicótico agudo. Su mecanismo de acción común se basa en el bloqueo postsináptico de los receptores dopaminérgicos D2, lo que justifica su utilidad en el tratamiento de los síntomas positivos de la enfermedad.¹

Antipsicóticos atípicos, estos fármacos constituyen una auténtica revolución en el tratamiento de esta enfermedad. Se incluyen compuestos como clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona y aripiprazol.

Presentan un bloqueo dopaminérgico selectivo, que justificaría su eficacia sobre los síntomas positivos con menor producción de síntomas extrapiramidales; al mismo tiempo también producen un bloqueo serotoninérgico, que explicaría su eficacia sobre los síntomas negativos y los trastornos anímicos. La eficacia que alguno de estos compuestos presenta sobre los síntomas cognitivos se justificaría por su acción sobre los receptores colinérgicos.¹

2.2.2 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.¹⁴

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.⁴

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.³

Tabla 1: Actividad enzimática de los diferentes alelos del *CYP2D6*.¹⁴

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.⁶

2.2.2.1 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.¹⁴

2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa más conocida como PCR por las siglas derivadas del inglés (*Polymerase Chain Reaction*) fue concebida por el Dr. Kary Mullis a principios de la década del 80.

Definición.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplía millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

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 vivos 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 del 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. El 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 *Thermusaquaticus*, 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 estas 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 μ L.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 MgCl₂ es de 1,5mM si se emplean concentraciones de 200 μ M 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 μ M para cada desoxirribonucleótido a fin de tener una especificidad y fidelidad óptima a altas velocidades de incorporación. Cuando se tiene 200 μ M de cada dNTP, hay suficiente material como para sintetizar 12,5 μ g 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 50mM de dNTPs en la PCR inhibe la actividad de la TaqADN 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 μ 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 TaqADN 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ incrementa la eficiencia de la PCR por incrementar la estabilidad de la Taqpolimerasa.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:

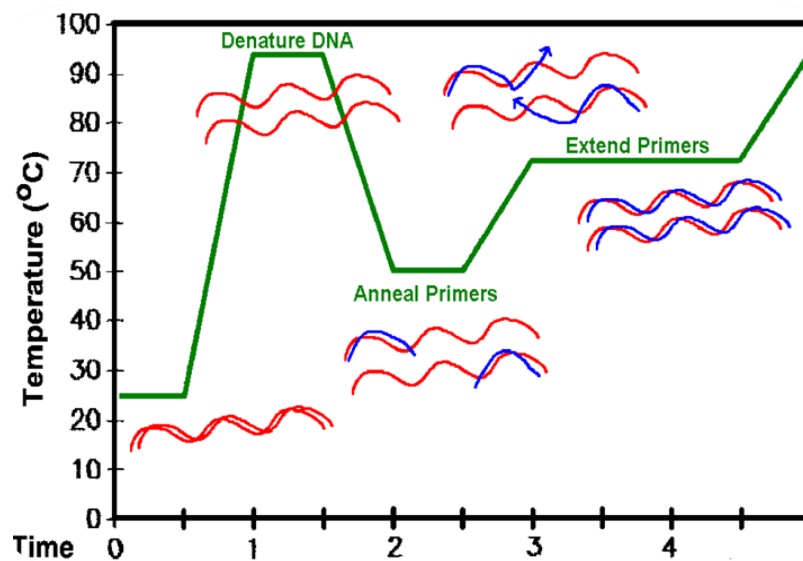


Figura 1: Etapas PCR (*PolymeraseChainReaction*)

Etapa I	Desnaturalización
Etapa II	Hibridación
Etapa III	Extensión

Durante los primeros ciclos de reacción, el ADN se desnaturaliza 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, meltingtemperature) 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 Tm 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

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

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 Taqpolimerasa 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 porhibridación.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. 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 de 1000 pb, aquellos que tengan mayor tamaño se denominan XL-PCR y obviamente se requiere de un 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 interno que contiene el segmento diana.⁴⁻⁶

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.⁶

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 julio de 2017 a setiembre de 2017.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población estuvo constituida por todos los pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad de Ayacucho.

3.2.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por 20 pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad 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.

3.2.3 Muestreo

El muestreo se realizó por conveniencia (muestreo no probabilístico).

3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1 Recolección de la muestra

Se llenó la ficha de datos de los pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad de Ayacucho durante el año 2017, que voluntariamente aceptaron participar en el presente estudio, firmando la carta de consentimiento informado, adjunto en el anexo N° 3

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.

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 µL 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 µL 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.

3.3 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. XL-PCR para la amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*.

La fórmula del “mix” para una reacción con un volumen final de 50µL, se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO₄ 1,5 mM, desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) 0,2mM, primer Fw (forward) **5´CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA3´** 0,5µM, primer Rv (reverse) **5´GGCTGGGTCCCAGGTCATAC3´** 0,5µM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 2,0 U, y se colocó tres “punch” como ADN molde que contenía ADN de sangre capilar.

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 30s, 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, este gel se bañó con bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos y seguido de dos enjuagues suaves con agua corriente, luego 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.

3.4.2 PCR anidado para la detección de los *alelos CYP2D6*1, CYP2D6*4 y CYP2D6*6*, a partir del producto XL-PCR (amplicón).

La fórmula del “mix” para una reacción con un volumen final de 50µL, 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; 10 µL de ADN molde que fue el amplicón (producto del XL-PCR).

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 fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 voltios durante 90 minutos, este gel de agarosa se bañó con bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos y seguido de 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 PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*3*.

La fórmula del “mix” para una reacción con un volumen final de 25µL, 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* **new5'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 “punch” conteniendo ADN de sangre capilar, para cada tubo.

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 el corrido por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % a 60 voltios durante 90 minutos, este gel de agarosa se bañó con bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos y seguido de dos enjuagues suaves con agua corriente, luego 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.

IV. 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 esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".

DETECCIÓN DE GEN Y ALELOS EN PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS	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	18	2
Ausente	0	2	18
TOTAL	20	20	20

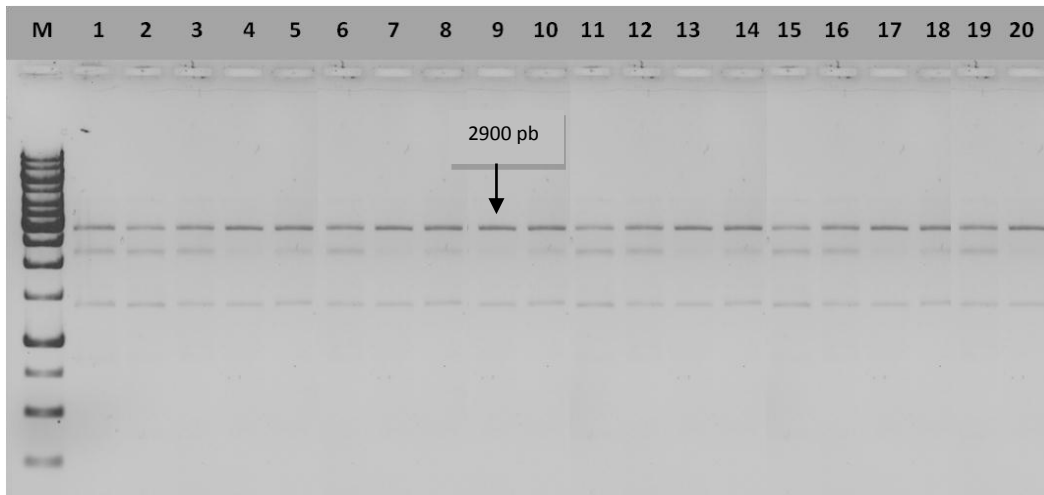


Figura 2: Productos de la amplificación de 2 900 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de pacientes esquizofrénicos, mediante XL-PCR con tres “punch” de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 1,5%.

Leyenda:

Carril M: marcador de tamaño molecular (*ladder* 1Kb)

Carril 1 al 20: con muestra del paciente 01 a 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.

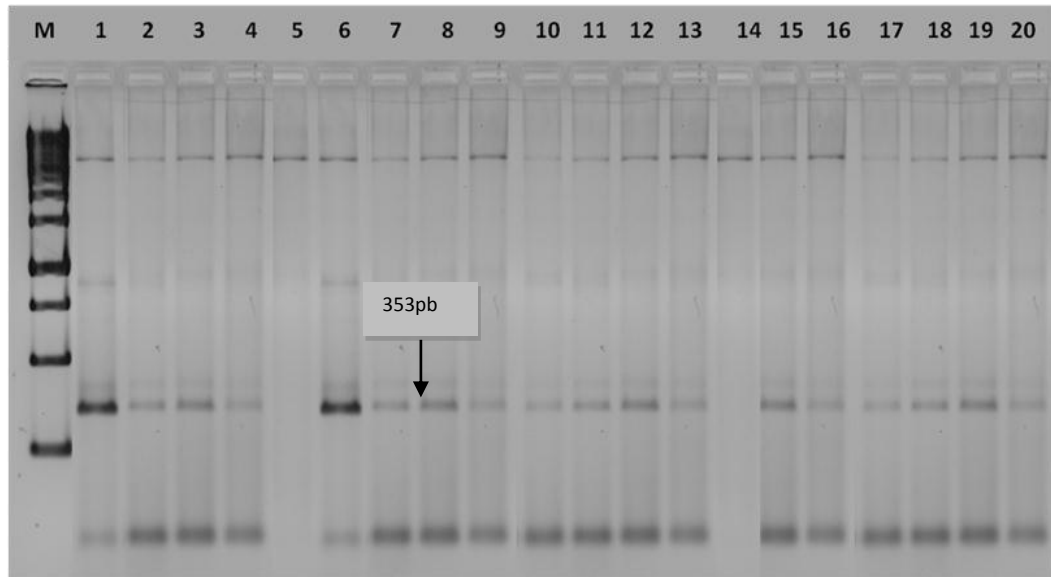


Figura 3: Productos de la amplificación de 353 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de pacientes esquizofrénicos, mediante PCR anidado para la detección de los alelos *CYP2D6*1*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*6*, en agarosa al 2.5%.

Leyenda:

Carril M: con *ladder* 1Kb

Carril 1 al 20: con muestra del paciente 01 al 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.

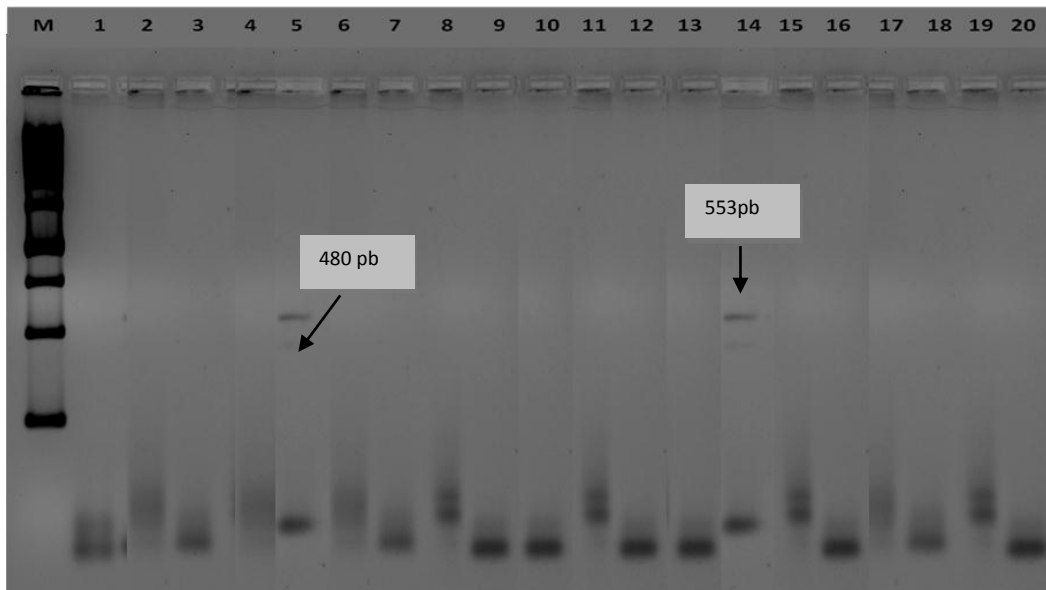


Figura 4: Productos de la amplificación de 553 pb y 480 pb del fragmento del gen *CYP2D6* de 20 pacientes, mediante PCR tetraprimer para la detección del alelo *CYP2D6*1* y *CYP2D6*3*, con tres "punch" de tarjeta FTA conteniendo ADN de sangre capilar, corrido en electroforesis con gel de agarosa al 2.5 %.

Leyenda:

Carril M: con *ladder* 1Kb

Carril 1 al 20: con muestra del paciente 01 al 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.

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 esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA", 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 18 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 (no se pudo continuar con la investigación porque lamentablemente no se pudo adquirir la enzima no se encuentra disponible en el mercado nacional).

La detección de éste fragmento, nos permite deducir que el genotipo de cada una de las 18 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,⁶ Alanis,⁷ Heras⁸ y Bañuelos⁹, que mencionamos a continuación:

Grimán⁶, realizó estudios sobre las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en la población de la región centro occidental de Venezuela, teniendo como resultado el alelo más frecuente *CYP2D6**4 con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas.

Alanis⁷, 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.

Heras⁸, 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 Bañuelos⁹, 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 dos 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 dos 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 dos casos de pacientes heterocigotos *1/*3, coinciden con lo planteado por Sachse⁴, 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 Grimán⁶, 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 2, muestra 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%. La figura 1, corresponde a los pacientes de 1 al 20, respectivamente. 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 3 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*; la figura 3 corresponden a los pacientes de 1 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 4, representa los productos de amplificación de 553 pb y 480 pb, del fragmento del gen *CYP2D6* de 20 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 2,5%. Los carriles 5 y 15 corresponde a los pacientes que presentan un alelo silvestre y el otro alelo mutante *3, constituyendo personas heterocigotas para el gen *CYP2D6*, los otros carriles revelan los resultados de los otros 18 pacientes en estudio, quienes no presentan alelo mutante *3; el carril 1 es del ladder o marcador de tamaño molecular.

VI. CONCLUSIONES

1. Los fenotipos metabolizadores de las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de 20 pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA", todos presentan genes heterocigotos, por tanto, todos tienen al menos un alelo *1 silvestre, cuyo fenotipo corresponde a la actividad enzimática normal.
2. Las variantes alélicas *1, *3, *4 y *6 del gen *CYP2D6* de 20 pacientes esquizofrénicos en estudio, corresponde a 18 pacientes con genes heterocigotos, dentro de las tres posibilidades: *1/*1 ó *1/*4 ó *1/*6; y dos pacientes con genes heterocigotos *1/*3.

VII. RECOMENDACIONES

1. Estandarizar técnicas en procesos de digestión enzimática a los productos del PCR anidado, que permita discriminar alelos *1 silvestre, *4 mutante y *6 mutante.
2. 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.
3. Impulsar trabajos de investigación sobre estudios de Farmacogenética y Farmacogenómica en las en las universidades del Perú, para así poder mejorar la calidad de vida de nuestra población.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

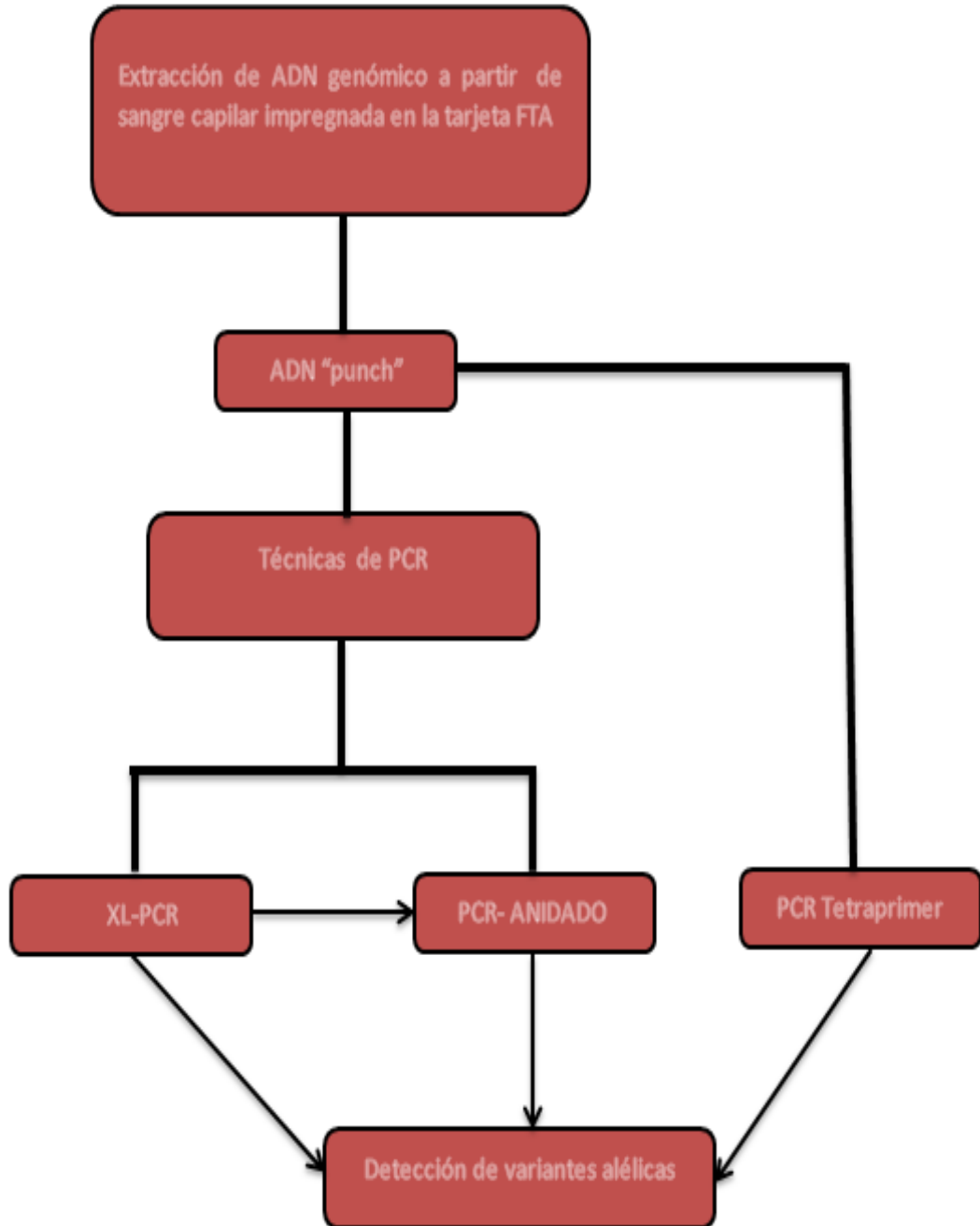
1. Llerena A, Caceres MC, Peñas-Lledo. Schizophrenia stigma among medical and nursing undergraduate European Psychiatry. 2002.
2. Roche Diagnostics. Estudio exploratorio del efecto de tamoxifeno sobre la concentración plasmática de su principal metabolito activo (endoxifeno) en pacientes con cáncer de mama hormona dependiente 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
3. Mendoza R, Wan Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman N. polymorphism in a Mexican American population. 2001.
4. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: 1998.
5. Edeki T. Clinical importance of genetic of drug oxidation. Mount Sinai J. Med. 1996.
6. Grimán P, Moran Y, Camargo M y Chiurillo M. Caracterización de variantes alelicas 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
7. 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:
8. Mendoza R, Wan Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman N. polymorphism in a Mexican American population. 2001.
9. 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>
10. Heras G. Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen CYP2D6 del citocromo P450, en población sana del Ecuador. 2010.
11. 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>
12. Johnstone EC, Geddes. How high is the relapse rote in schizopfhrenia? Acta Psychits scand suppl. 1994.
13. Kalow W. The Pennsylvania State University, College of Medicina, Bernard B. Brodie lectura. Pharmacogenetics past anda future life sci. 1990.
14. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004.
15. Llerena A, Cobaleda J, Martinez C, Benitez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. [revista en internet]. 1996. [acceso abril de 2014]. Disponible: en: <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
16. 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.

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. 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 Drug Metab Pharmacokinet. [revista en internet]. 1996. [acceso abril de 2014]. Disponible: en: <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
19. 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.
20. Griffin H.G., Griffin A.M. PCR Technology Current Innovations. CRC Press. Inc Estados Unidos.1994.
21. Bernard S, Neville K, Nguyen AT, Flockhart D. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP26 in the U.S. population.2006.
22. Menoyo A, Baiget M. Caracterización de variantes alélicas del citocromo CYP2D6 en una comunidad española. 2005.

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 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 algunos 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



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 periodo 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 ayudará 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 mestiza 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 Blgo. 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. Blgo. 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 _____

¿Se le otorgó copia al participante?: Sí No

Nombre y firma del Investigador _____



Huella digital

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

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 esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho "COSMA".

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	Paciente 01	Presente	Presente	Ausente
2	Paciente 02	Presente	Presente	Ausente
3	Paciente 03	Presente	Presente	Ausente
4	Paciente 04	Presente	Presente	Ausente
5	Paciente 05	Presente	Presente	Presente
6	Paciente 06	Presente	Presente	Ausente
7	Paciente 07	Presente	Presente	Ausente
8	Paciente 08	Presente	Presente	Ausente
9	Paciente 09	Presente	Presente	Ausente
10	Paciente 10	Presente	Presente	Ausente
11	Paciente 11	Presente	Presente	Ausente
12	Paciente 12	Presente	Presente	Ausente
13	Paciente 13	Presente	Presente	Ausente
14	Paciente 14	Presente	Presente	Presente
15	Paciente 15	Presente	Presente	Ausente
16	Paciente 16	Presente	Presente	Ausente
17	Paciente 17	Presente	Presente	Ausente
18	Paciente 18	Presente	Presente	Ausente
19	Paciente 19	Presente	Presente	Ausente
20	Paciente 20	Presente	Presente	Ausente

Anexo 5

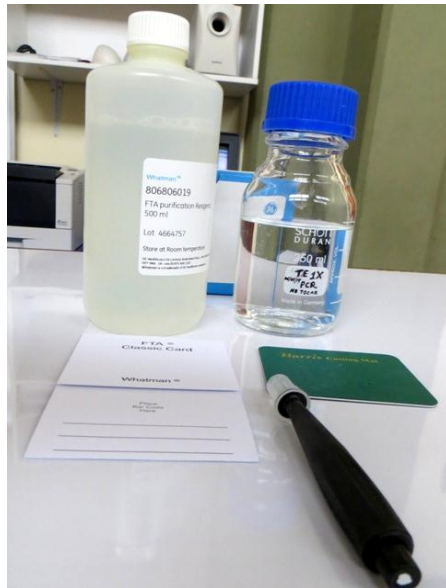


Figura 5. Reactivos para extracción de ADN en Tarjetas FTA



Figura 6. Cabinas pre-PCR, preparación del "mix" para XL – PCR.



Figura 7. Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjetas FTA

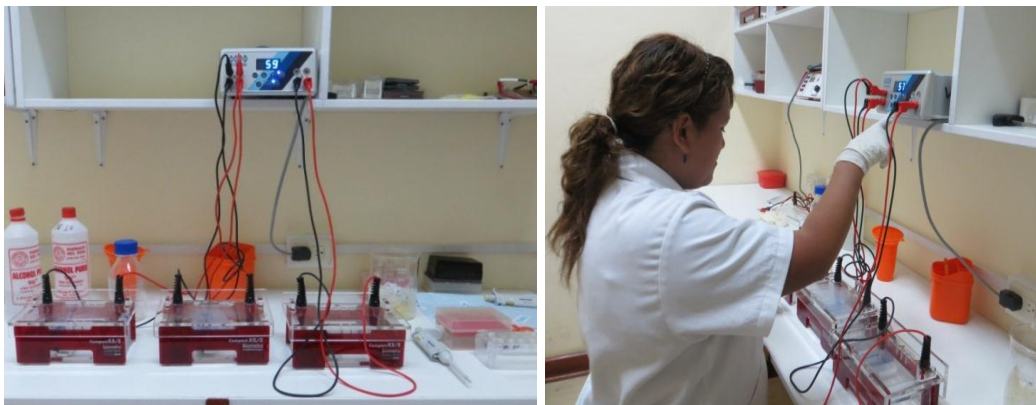


Figura 8 Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjetas FTA



Figura 9. 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 %.

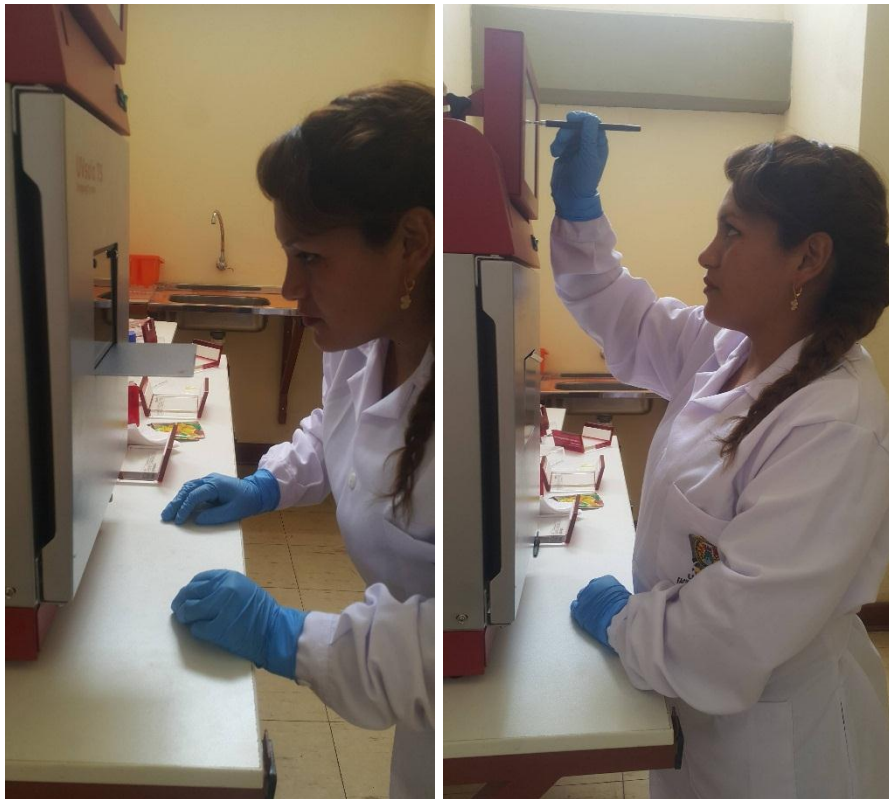


Figura 10. Sistema de registrador de imágenes Biometra *UV solo TS* del gel de agarosa con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN capilar en tarjeta FTA, con bromuro de etidio al 1%.

Anexo 6

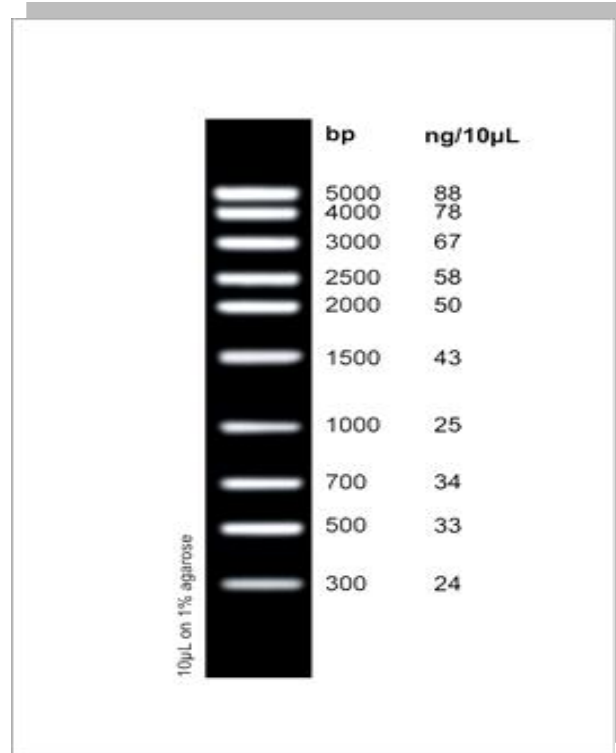


Figura 11. Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del "ladder 1 kb"

Anexo 7

Tabla 4. 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(μL)	20 Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	100,0
MgSO4	25 mM	1,5 mM	3,0	60,0
dNTP's	2.5 mM	0,2mM	5,0	100,0
Primer Fw	10 uM	0,5 uM	2,5	50,0
Primer Rv	10 uM	0,5 uM	2,5	50,0
KOD polimerasa	1 U/UI	2,0 U	2,0	40,0
ADN molde			punch	03 punch
H ₂ O PCR			30,0	600
TOTAL			50.0	1000.0

Programa XL-PCR	Desnaturalización Inicial		95 °C x 5 min
	35 Ciclos	Desnaturalización	95 °C x 30 s
		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 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 <i>CYP2D6*4</i> Y <i>CYP2D6*6</i> del producto XL-PCR (amplicón)				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(µL)	20 Rx(µL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	100,0
MgCl ₂	50 Mm	1,5 mM	1,5	30,0
dNTP's	10 mM	0,2mM	1,0	20,0
Primer Fw*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	50,0
Primer Rv*4*6	10 uM	0,5 uM	2,5	50,0
<i>Platinum Taq</i> DNA polimerasa	1 U	0,2µL	0,2	4,0
ADN amplicón			10	200
H ₂ O PCR			27,3	546,0
TOTAL			50,0	1000,0

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

Anexo 9

Tabla 6. Condiciones 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 <i>CYP2D6*3</i> por PCR tetraprimer				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(μL)	20 Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	2,5	05,0
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75	15,0
dNTP's	10 mM	0,4mM	1,0	20,0
Primer *3	10 uM	0,12 uM	0,3	6,0
Primer *4 NEW	10 uM	0,12 uM	0,3	6,0
Primer *6	10 uM	0,3 uM	0,75	15,0
Primer AWT	10 uM	0,3 uM	0,75	15,0
KOD polimerasa	5U/ μL	1,25 U	0,25	5,0
ADN			Punch	punch
H ₂ O PCR			18,4	368,0
TOTAL			25,0	500,0

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

ANEXO 10
MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Fenotipos metabolizados del gen <i>CYP2D6</i> de pacientes esquizofrénicos en tratamiento con fármacos antipsicóticos . Ayacucho, 2017.	¿Cuáles serán los fenotipos metabolizadores del gen <i>CYP2D6</i> de pacientes esquizofrénicos en tratamiento con fármacos antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” en la ciudad de Ayacucho el 2017?	<p>GENERAL</p> <p>Describir los fenotipos metabolizadores del gen <i>CYP2D6</i> de pacientes esquizofrénicos en tratamiento farmacológico con antipsicóticos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad de Ayacucho.</p> <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar las variantes alélicas del gen <i>CYP2D6</i>, reproducido mediante la técnica de PCR-RFLP. 	Aspectos teóricos de Gen <i>CYP2D6</i> , fenotipos metabolizadores. Esquizofrenia. Antipsicóticos	Los pacientes esquizofrénicos de la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad de Ayacucho, que se encuentran recibiendo el tratamiento con fármacos antipsicóticos, presentan diferentes fenotipos metabolizador es del gen <i>CYP2D6</i> .	<p>Variable Principal: Pacientes esquizofrénicos la Comisión de Salud Mental de Ayacucho “COSMA” de la ciudad de Ayacucho, en tratamiento farmacológico con antipsicóticos.</p> <p>Indicador: - Edad, sexo, grupo étnico.</p> <p>Variable secundaria: Fenotipo metabolizador del gen <i>CYP2D6</i>.</p> <p>Indicador: Frecuencia de las variantes alélicas y genotípicas del gen <i>CYP2D6</i>.</p>	<p>Tipo de investigación: Básica – descriptivo.</p> <p>Nivel de investigación: Básico</p> <p>Definición de la población y muestra: Procedimiento para la recolección de muestra.</p> <p>Diseño Experimental: Extracción de ADN de tejido sanguíneo Se amplificará mediante XL-PCR el gen <i>CYP2D6</i>. Se realizará digestiones enzimáticas y los productos se observarán por electroforesis.</p>