

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA  
Y BIOQUÍMICA



Estandarización de la reacción en cadena de la  
polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir  
de linfocito humano. Ayacucho, 2013

TESIS PARA OPTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:

Bach. **ARANGO PALOMINO, LUCERO AMPARO**

AYACUCHO – PERÚ

2014

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

**Bach:** Lucero Amparo ARANGO PALOMINO

**R.D.N:** 076 – 2014 – FCB – D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro y cinco de la tarde del día primero de Agosto del dos mil catorce, en el auditorio de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos los miembros del jurado evaluador con la finalidad de recepcionar en acto público, la tesis presentada por la Bach: en Farmacia y Bioquímica Lucero Amparo ARANGO PALOMINO, cuyo título es Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir de linfocito humano. Ayacucho 2013, integrada por los profesores Mg. José Manuel Diez Macavilca como presidente del jurado evaluador y a su vez como miembro, la encargatura es mediante memorando N° 285- 2014- UNSCH- FCB e integrada por el Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista y el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich e integrada como secretario docente por el Blgo. Elbert Hermoza Valdivia.

Una vez apuntada la documentación que sustenta el acta Mg. José Diez Macavilca en calidad de presidente (e) del jurado evaluador autoriza a la Srta sustentante de inicio a la exposición de su tema en el tiempo no mayor de 45 minutos, lo cual es hecho por la sustentante.

Concluida la sustentación el presidente (e) invita a los miembros del jurado puedan realizar sus preguntas y así como solicitar las aclaraciones necesarias. Dando respuesta a ellas la Srta sustentante.

Concluida con esta parte se invita al público asistente puedan hacer abandono del ambiente con la finalidad efectuar las discusiones y realizar la calificación respectiva, hecho lo cual se tiene el resultado siguiente:

Jurado evaluador	Exposición	Respuesta	Promedio
Mg. José Manuel Diez Macavilca	18	18	18
Mg. Saturnino M. Tenorio Bautista	18	18	18
Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich	19	20	20
		Promedio:	19

Con lo que se desprende que ha obtenido una nota de diecinueve (19) que es aprobatoria.

Una vez realizada esta parte se invita a la sustentante y público para que pueda ingresar al auditorio con la finalidad de dar a conocer el resultado, y en fe de lo que firman al pie del documento.

El acta de sustentación culmina siendo las cinco de la tarde con cuarenta y cinco minutos.



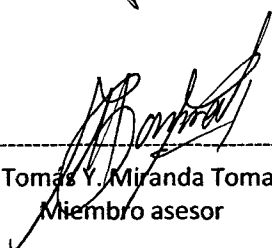
---

Mg. José Manuel Díez Macavilca  
Miembro presidente (e)




---

Mg. Saturnino M. Tenorio Bautista  
Miembro



---

Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich  
Miembro asesor



---

Blgo. Élbort Hermoza Valdivia  
Secretario docente

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme culminar una etapa más de mi vida, a mis maravillosos padres y hermanos por su gran apoyo y cariño incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por permitirme realizar y culminar mi carrera; y a los catedráticos por su constancia en el desarrollo profesional de sus alumnos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en merito especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los catedráticos de dicha Escuela por contribuir en el conocimiento y orientación de nuestra formación profesional en el transcurso de ser universitarios.

A mis asesores Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH y Dr. Jhonny Aldo TINCO JAYO, por dedicarme el tiempo y disponibilidad necesaria para la elaboración del proyecto durante la ejecución y culminación.

A mis queridos padres Eloy y Amparo y a mis hermanos Geraldine y Víctor por su apoyo incondicional, cariño y comprensión en cada etapa de mi vida.

A toda las personas que han estado conmigo y me han brindado su amistad, apoyo y consejos.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes.	4
2.2 Descripción del gen CYP2D6.	9
2.2.1 Variabilidad genotípica y fenotípica.	10
2.3 La reacción en cadena de la polimerasa PCR.	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Ubicación del trabajo de investigación.	20
3.2 Definición de población y muestra.	20
3.2.1 Población.	
3.2.2 Muestra.	
3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos.	20
3.3.1 Recolección e identificación de la muestra.	20
3.3.2 Obtención del ADN genómico de linfocitos humanos.	21
3.3.3 Cuantificación de ADN genómico de linfocito humano.	22
3.3.3.1 Por espectrofotometría ultravioleta – Eppendorf BioPhotomer Plus.	22
3.3.3.2 Por electroforesis.	23
3.4 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	24
3.4.1 Pasos para la reacción en cadena de la polimerasa.	24
3.4.2 Detección de los amplicones del gen CYP2D6.	24
3.4.3 Amplificación de fragmento del gen CYP2D6, mediante XL-PCR con 50 ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.	24
3.4.4 Amplificación de fragmento del gen CYP2D6, mediante XL-	25

PCR con 100 ng/ $\mu$ L de ADN genómico de linfocito humano.

3.4.5	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de Primer.	25
3.4.6	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de KOD Polimerasa.	26
3.4.7	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR con gradiente de temperatura de hibridación.	26
3.4.8	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de MgSO <sub>4</sub> .	26
3.4.9	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR para la Reproducibilidad.	27
3.5	Interpretación de los resultados.	27
IV.	RESULTADOS	28
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIONES	40
VII.	RECOMENDACIONES	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXOS	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad enzimática de los diferentes alelos del <i>CYP2D6</i> .	10
Tabla 2. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta – Eppendorf BioPhotometer Plus, de ADN genómico extraído de linfocito humano.	28
Tabla 3. Leyenda de la figura 2	30
Tabla 4. Leyenda de la figura 3	31
Tabla 5. Leyenda de la figura 4	32
Tabla 6. Leyenda de la figura 5	33
Tabla 7. Leyenda de la figura 6	34



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0% de seis muestras ADN genómico extraído de linfocito humano.	29
Figura 2. Productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> con 50ng y 100ng de ADN genómico de linfocitos humanos, en gel de agarosa al 1,5%.	30
Figura 3. Productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos con diferentes concentraciones de "primer", en gel de agarosa al 1,5%.	31
Figura 4. Productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos con diferentes concentraciones de KOD Polimerasa, en gel de agarosa al 1,5%.	32
Figura 5. Productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos, con gradiente de temperatura de hibridación, en gel de agarosa al 1,5%.	33
Figura 6. Productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos, con diferentes concentraciones de MgSO <sub>4</sub> , en gel de agarosa al 1,5%.	34
Figura 7. Reproducibilidad de la técnica de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos, con las concentraciones y volúmenes de los componentes estandarizados, en gel de agarosa al 1,5%.	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Flujograma para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen <i>CYP2D6</i> a partir de ADN genómico de linfocito humano.	48
Anexo 2	Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico de linfocito humano.	49
Anexo 3	Extracción del ADN genómico de linfocito humano.	50
Anexo 4	Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta del ADN genómico de linfocito humano extraído.	51
Anexo 5	Cabina pre-PCR, preparación del "mix" para XL – PCR.	52
Anexo 6	Programación del termociclador para la reacción XL-PCR de gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocitos humanos.	53
Anexo 7	Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocito humano.	54
Anexo 8	Sembrando los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocito humano en la cámara de electroforesis.	55
Anexo 9	Coloración del gel de agarosa conteniendo los productos de XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> de ADN genómico de linfocito humano, con bromuro de etidio al 1,5 %.	56
Anexo 10	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 genómico de linfocito humano.	57
Anexo 11	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR con 50 ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.	58
Anexo 12	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR con 100 ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.	59
Anexo 13	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de Primer.	60
Anexo 14	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de KOD polimerasa (Hot Start Master Mix).	61
Anexo 15	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR con gradiente de temperatura de hibridación.	62
Anexo 16	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de MgSO <sub>4</sub> .	63

Anexo 17	Amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i> , mediante XL-PCR para la Reproducibilidad.	64
Anexo 18	Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del "ladder 1 kb".	65
Anexo 19	Matriz de consistencia.	66

## RESUMEN

La prescripción de los fármacos se formula sobre la base de las características farmacológicas y la posibilidad de obtener resultados clínicamente reproducibles. Sin embargo, muchos de los fármacos son eficaces en sólo 25% a 60% de los pacientes, por lo tanto, muchos pacientes no responden a los tratamientos e incluso experimentan reacciones adversas e intoxicaciones. Existen variaciones individuales en las respuestas a fármacos que pueden deberse a diversos efectos y predeterminación genética según la población y etnia, como gen *CYP2D6* es importante en el metabolismo de fármacos; se planteó como objetivo estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir de ADN genómico de linfocito humano y determinar las condiciones físicas y químicas de los componentes para la reacción. Para el estudio se utilizó seis unidades de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para descarte) de personas que habitan en la ciudad de Ayacucho, se sometieron a prueba las concentraciones de los diferentes compuestos del mix, así como las temperaturas y tiempo para el proceso de XL-PCR, y amplificar el gen *CYP2D6* con el uso de un termociclador Eppendorf Master Cycler Plus, electroforesis, coloración en gel de agarosa y Sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS.

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, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, desoxirribonucleósidos 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 100 ng/µL; 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 concluye que con estas condiciones físicas y químicas determinadas, es posible la amplificación de un segmento del gen *CYP2D6* mediante XL-PCR, en la población humana de Ayacucho, que permitirá desarrollar otros trabajos de investigación con éste gen.

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

## I. INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica se observan pacientes tratados con la misma dosis de un fármaco, variabilidad, en respuesta terapéutica y en los efectos adversos. Esta variabilidad puede ser debida a factores farmacodinámicos o farmacocinéticos. El metabolismo es un proceso farmacocinético determinante en la eliminación y por tanto de las concentraciones plasmáticas del fármaco y metabolitos.<sup>1</sup>

Está ampliamente aceptado que factores genético - ambientales pueden modificar la actividad de estas enzimas y ser causantes de diferencias en la concentración plasmática, por tanto, en la respuesta terapéutica de los fármacos.<sup>2</sup>

Cada enzima P450 es codificada por un gen. Existen un gran número de estas enzimas en humanos (actualmente más de 50), y están divididas en 18 familias. La división está basada en el grado de homología de la secuencia de los genes. Los genes que presentan un 40% o más de homología se clasifican en la misma familia y se denominan con el prefijo *CYP* seguido de un número arábigo, que se refiere a la familia.<sup>2</sup>

"CYP" es la abreviatura de citocromo P-450, un subgrupo de enzimas relacionadas o isoenzimas situados en el retículo endoplásmico y expresado principalmente en el hígado. También está presente en otros órganos, tales como el intestino y el cerebro.<sup>3</sup>

Las enzimas CYPs participan en la eliminación de xenobióticos (fármacos, carcinógenos, pesticidas, etc.) y en la degradación de sustancias producidas por el propio organismo (esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles A y D, alcaloides endógenos, etc.).<sup>2</sup>

Cada año las personas sufren las complicaciones de las reacciones adversas a los medicamentos, pero con los estudios de la biología molecular hay esperanza para evitar que miles de estas personas sufran o mueran innecesariamente. El gen *CYP2D6* es responsable de metabolizar una gran parte de fármacos. Debido a la importancia de este gen, se han adoptado estudios de diversos enfoques para analizar el gen *CYP2D6*.<sup>2</sup>

El descubrimiento del gen *CYP2D6* ha creado un nuevo interés en el papel de la farmacogenética y en la farmacología clínica. El polimorfismo genético se ha vinculado a tres clases de fenotipos basados en la medida de la metabolización del fármaco. Metabolismo Extensivo (EM), cuando un medicamento es característico de la población normal; Metabolismo Lento (PM) se asocia con la acumulación específica de sustratos de drogas y es típicamente una enfermedad autosómica con un rasgo recesivo que requiere la mutación y/o delección de ambos alelos para la expresión fenotípica, y Metabolismo Ultra Extensivo (UEM) cuando se traduce en el aumento del metabolismo de las drogas y surge un rasgo autosómico dominante del gen amplificado.<sup>3</sup>

Otros autores lo clasifican en cuatro fenotipos: Metabolizadores Pobres (MP) cuando la actividad enzimática es nula, Metabolizadores Ultrarrápidos (UEM) cuando la actividad enzimática está incrementada debido a la existencia de múltiples copias del gen. Metabolizadores Extensivos (ME) a individuos con actividad normal y Metabolizadores Intermedios aquellos que tienen actividad enzimática disminuida (MI).<sup>4</sup>

El gen *CYP2D6* codifica la enzima monooxigenasa perteneciente al citocromo P450, la cual está involucrada en la biotransformación de un gran número de drogas como antidepresivos, antineoplásicos y antihipertensivos. Algunos efectos adversos, así como falla terapéutica esta relacionado con la actividad anormal de *CYP2D6* producto de polimorfismos en el gen de dicha enzima.<sup>2</sup>

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, para cuya ejecución se requiere la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR motivo por el que formulamos el presente trabajo que se desarrolló durante cinco meses, el mismo que se inició en setiembre de 2013 y culminándose en el mes de Marzo del año 2014 en la ciudad de Ayacucho.

**Objetivo General:**

- Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir de ADN genómico de linfocitos humano.

**Objetivos Específicos:**

- Obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) de linfocito humano mediante extracción orgánica.
- Determinar las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para amplificar el gen *CYP2D6*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

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.<sup>5</sup>

La variabilidad se atribuye en parte a factores genéticos, pero también a otros factores tales como los factores ambientales y fisiológicos que pueden influir en los parámetros farmacocinéticos, concentraciones plasmáticas y la respuesta terapéutica a los fármacos. Entre los factores más importantes que pueden influir en estos parámetros se encuentra el género. En un estudio previo en mujeres voluntarias sanas se encontraron diferencias en la capacidad metabólica de *CYP2D6* durante las diferentes fases del ciclo menstrual y también después de una ovariectomía.<sup>6</sup>

También existen diferencias por la edad. Los antipsicóticos se usan frecuentemente en personas jóvenes. Los ancianos pueden presentar niveles



plasmáticos de fármaco mayores que los pacientes jóvenes, como se ha demostrado después de la administración de una dosis única de tioridazina.<sup>7</sup> Sin embargo, la actividad de la enzima CYP2D6 no parece estar influenciada por la edad.<sup>8,9</sup>

La actividad de la enzima CYP2D6 influye en la concentración plasmática de algunos fármacos antipsicóticos y sus metabolitos. En individuos (PM) las dosis normales de fármacos podrían causar de improviso altas concentraciones plasmáticas y así podrían aparecer efectos secundarios dependientes de la dosis, o síntomas tóxicos<sup>10</sup>. Por otro lado en (MUE) la disposición de los fármacos podría estar incrementada en comparación con sujetos "normales"; por tanto, después de la administración de una dosis media diaria, las concentraciones plasmáticas del fármaco podrían ser inferiores y dar lugar a un fracaso terapéutico.<sup>10</sup>

En la actualidad están disponibles en el mercado dos test farmacogenéticos, aprobados para su uso clínico, que pueden ser útiles en la prescripción de antipsicóticos. Uno de ellos es el Amplichip CYP450 (Roche, Basel, Switzerland), que estima la capacidad metabólica del paciente basándose en polimorfismos del *CYP2D6* y *CYP2C19*. Otro caso es el de PGx Predict (Clinical Data, Inc., New Haven, CT) para la clozapina, que predice el riesgo de aparición de agranulocitosis como efecto secundario de este antipsicótico. También se está intentando obtener test genéticos que sean coste - efectivos, para que en un futuro se puedan implementar en la práctica clínica como pruebas de rutina. Todos estos esfuerzos pretenden cristalizar en la creación de modelos predictivos basados en factores genéticos y ambientales que servirán como una herramienta útil en la selección de las dosis y los fármacos más adecuados.<sup>11</sup>

Según estudios realizados en España, los individuos portadores de alelos nulos de enzima CYP2D6 presentarían una protección contra esquizofrenia ya que

presentarían menores niveles de dopamina en el cerebro. Los resultados han sido negativos, sin encontrar relación entre los polimorfismos y la susceptibilidad a sufrir esta enfermedad.<sup>12</sup> Estos resultados están de acuerdo con otros estudios en los que no se llega a demostrar dicha relación.<sup>13</sup>

En lo que respecta al cáncer del pulmón hay numerosos estudios publicados. (Bouchardy y col. 1996), encontraron que aquellos fumadores con actividad alta de la enzima CYP2D6 y alto consumo de tabaco presentaban un riesgo más alto de sufrir un cáncer de pulmón. Esta asociación podría deberse a que la enzima CYP2D6 puede activar un componente del tabaco denominado 4-(N-metil nitrosamina) -1- (3 piridil) -1- butanona (NNK), que es mutagénico.<sup>14</sup>

En un caso de un estudio de tuberculosis pulmonar; en India, es probable que el gen *CYP2D6* este estrechamente vinculada en combinación con otros genes y factores del huésped que pueden influir en el metabolismo de los fármacos antituberculosos durante el tratamiento. Debido a la alteración del fármaco en el metabolismo, algunas de las bacterias pueden someterse a latencia y más tarde ser reactivada después de la finalización del tratamiento.<sup>15</sup>

En México el estudio realizado, (Bañuelos y col. 2007), 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.<sup>16</sup>

En España estudios, (Rodríguez y col. 2010), 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.<sup>17</sup>

En Cuba, (Bárbaro y col. 2005), se realizó el 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.<sup>18</sup>

En Ecuador existe gran variabilidad interindividual en el metabolismo de dextrometorfano en la población de voluntarios sanos mestiza. Existen diferencias en el fenotipo metabólico de dextrometorfano entre la población ecuatoriana y la española. El porcentaje de (PM) es mucho menor que en España (0,9%/10%). En el resto de la población (EM), la capacidad metabólica evaluada (*CYP2D6*) en la población ecuatoriana está disminuida en comparación con la española. Adicionalmente, no se han descrito (UM) en Ecuador, cuya frecuencia es elevada en la población española; trabajo realizado (Esther Machín García, 2012).<sup>19</sup>

Igualmente en Japón estudios (Lay KekTeh, y Leif Bertilsson, 2012) con el tema de Farmacogenómica de *CYP2D6*: Genética Molecular, Diferencias interétnicas e importancia clínica; indica que el gen *CYP2D6* es altamente polimórfico y heterogéneo cuyos alelos muestran especificidades étnicas, donde el impacto clínico del metabolismo enzimático de los fármacos es mayor comparado con fármacos de estrecho margen terapéutico. Esto aumentaría la toxicidad en la población.<sup>20</sup>

El gen *CYP2D6* es un genotipo clínicamente para la predicción de la respuesta al tamoxifeno, medicamentos psicotrópicos y otros medicamentos. Estudiado en un artículo por (Jennifer M Skierka y col. 2012).<sup>21</sup>

En un estudio realizado, (Christine M Walko& Howard McLeod, 2012) y (José Luis Salcedo, 2012), de ajuste de dosis de tamoxifeno, el gen *CYP2D6* es muy necesario en la conversión al metabolito activo conocido como endoxifeno, para ejercer sus efectos anticancerosos; y se ajustó la dosis de acuerdo a la variación genética entre individuos, donde resultaron positivos.<sup>22,23</sup> El Fenotipo de predicción depende de genotipado exacto. Sin embargo las concentraciones

plasmáticas de endoxifeno en pacientes tratadas con tamoxifeno no sólo están relacionadas con el genotipo de la paciente para *CYP2D6* sino también con la toma de otros fármacos de conocida actividad inhibidora del citocromo *CYP2D6*.<sup>24</sup>

Si se pierde el gen o, por el contrario, se producen varias copias de él, lo que se traduce en ausencia o excesivas cantidades de enzima y, en consecuencia, el portador será un Metabolizador Lento o Ultrarrápido de los fármacos sustratos de la enzima.<sup>25</sup>

La consecuencia clínica del polimorfismo del *CYP2D6* puede ser la aparición de reacciones adversas a los medicamentos o de disminución de la respuesta. Los medicamentos más afectados por los polimorfismos *CYP2D6* son normalmente aquellos en los que representa una vía metabólica importante, tanto en la activación para formar metabolitos activos o de aclaramiento del fármaco.<sup>25</sup>

La detección del genotipo *CYP2D6* antes del tratamiento antiemético puede permitir la modificación de la dosis de antieméticos.<sup>26</sup>

Hasta la fecha, el impacto clínico de la presencia de los alelos *CYP2D6* no ha llegado a ser evaluado de forma sistemática para los fármacos de mayor importancia clínica que se metabolizan principalmente por el *CYP2D6*, Según una exhaustiva revisión reciente de (Ferriols y col, 2009).<sup>27</sup>

En Madrid España se realizó un estudio, (Antoni Sicras Mainary col. 2010), sobre combinaciones de medicamentos mediadas por la isoenzima *CYP2D6*, resultando un negativo impacto clínico y económico, que se debe tener en cuenta el potencial de las interacciones farmacológicas cuando se prescriben antidepresivos inhibidores o sustratos del *CYP2D6*.<sup>28</sup>

A nivel Nacional, un estudio realizado, (Youn Ho Kim, 2014); de la Universidad de San Martín de Porres. Se presentó una frecuencia de individuos con genotipo metabolizador lento que representó el 13 %, asimismo, se resalta la presencia de

un 87 % de individuos sin fenotipo metabolizador definido. También se detectó la presencia de alelos y genotipos Metabolizadores Lentos en pobladores peruanos de Andoas - Loreto, Chachapoyas - Amazonas, Abancay - Apurímac, Uros - Puno, San José - Lambayeque, y Lima - Lima.<sup>29</sup>

## **2.2 Descripción del gen *CYP2D6***

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 presentan actividad del gen que va de normal a disminuida o aumentada.<sup>30</sup>

El citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), es una de las más importantes enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el cuerpo. El gen *CYP2D6* codifica para una enzima perteneciente al citocromo P-450. El citocromo P-450 es una familia de hemoproteínas que juega un papel muy importante tanto en el metabolismo endógeno como exógeno.<sup>30</sup>

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.<sup>31</sup>

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, neurolepticos, algunos antiarrítmicos, bloqueadores  $\beta$  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<sup>32</sup>. Individuos con ciertos alelos presentan actividad del gen que va de normal a disminuida o aumentada<sup>30</sup>, afectando la vía metabólica de la eliminación de las drogas, mostrando una falla en la respuesta terapéutica.<sup>31</sup>

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

Alelo	Actividad enzimática
CYP2D6*1	Actividad normal
CYP2D6*2	Actividad normal*
CYP2D6*3	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*4	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*5	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*6	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*8	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*9	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
CYP2D6*10	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
CYP2D6*14	Ausencia total de actividad metabólica
CYP2D6*17	Disminución de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
CYP2D6*35	Aumento de la actividad enzimática frente a determinados sustratos
CYP2D6*41	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.<sup>30</sup>

### 2.2.1 Variabilidad genotípica y fenotípica

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), 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.<sup>33</sup> 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.<sup>34</sup>

### **2.3 La reacción en cadena de la polimerasa PCR**

En 1985 una ingeniosa técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) introdujo nuevas alternativas para la investigación científica y el diagnóstico clínico. Esta técnica fue desarrollada por el Dr. Kary B, Mullis (Nobel de Química en 1993), quién tuvo la brillante idea de realizar la duplicación del ADN *in vitro*. La idea inicial la tuvo una noche de 1983, cuando conduciendo su auto por California, pensaba en nuevas estrategias para mejorar la técnica de secuenciación del ADN. El Dr. Mullis pensó que usando dos oligonucleótidos iniciadores de orientación opuesta con la enzima ADN polimerasa permitiría generar *in vitro* un número ilimitado de copias de un fragmento de ADN de interés. Es así que las primeras amplificaciones *in vitro* de ADN se realizaron en forma manual empleando tres baños de agua termo controlados y aplicando una enzima termo sensible (Fragmento de Klenow de la ADN polimerasa aislada de *Escherichia coli*). Sin embargo, este sistema necesitaba la adición de la enzima cada ciclo debido a que ésta se inactivada durante la etapa de desnaturalización del ADN.<sup>35</sup>

Desde 1983, numerosas investigaciones se han realizado en la optimización de la PCR. Así, el primer avance importante fue el descubrimiento de Saiki<sup>35</sup> 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 *Thermus aquaticus*, fue la más usada. Otro gran avance fue el diseño de termocicladores automatizados que hacen a la técnica menos laboriosa.<sup>35</sup>

### **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.<sup>35</sup>

### **Componentes:**

**El ADN molde (diana, blanco).** Es el ADN del cual queremos copiar e incrementar la 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.<sup>35</sup>

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.<sup>35</sup>

**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.<sup>22</sup>

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.<sup>35</sup>

Se recomienda utilizar una concentración de oligonucleótidos iniciadores entre 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$ . Concentraciones más elevadas de las indicadas pueden promover la formación de productos no específicos.<sup>35</sup>

**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.<sup>35</sup>

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).<sup>35</sup>

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 en un volumen final de reacción de 20 – 100  $\mu L$ .<sup>35</sup>

**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 1,5 mM si se emplean concentraciones de 200  $\mu M$  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).<sup>35</sup>

**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  $\mu M$  para cada

desoxirribonucleótido a fin de tener una especificidad y fidelidad óptima a altas velocidades de incorporación. Cuando se tiene 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, hay suficiente material como para sintetizar 12,5  $\mu\text{g}$  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 50 mM de dNTPs en la PCR inhibe la actividad de la Taq ADN polimerasa.<sup>35</sup>

**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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y detergentes no iónicos como el Tween 20 ó Tritón X. Estos componentes pueden ser utilizados a fin de estabilizar la actividad de la Taq ADN polimerasa.<sup>35</sup>

**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.<sup>35</sup>

**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 Taq polimerasa.<sup>35</sup>

### **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.<sup>34</sup>

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 "extensión 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.<sup>35</sup>

**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 desnaturar todo el ADN e inactivar proteasas y ADNasas.<sup>35</sup>

**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.<sup>35</sup>

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.<sup>35</sup>

Si el ADN solo se desnatura parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los cebadores y una

posterior extensión.<sup>35</sup>

**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).<sup>35</sup>

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 de 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 la temperatura, concentración de ADN, oligonucleótidos iniciadores y  $Mg^{+2}$ .<sup>35</sup>

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.<sup>35</sup>

**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.<sup>35</sup>

**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.<sup>35</sup>

Finalmente, las muestras pueden ser almacenadas a 4° C hasta su posterior análisis.<sup>35</sup>

**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 UV gel de agarosa o por hibridación.<sup>35</sup>

Los ciclos repetidos de amplificación teóricamente conllevan a una síntesis exponencial de los fragmentos de ADN y están expresados en la siguiente fórmula:

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

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.<sup>30</sup>

**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 etidio.<sup>35</sup>

#### **Variantes de PCR: XL-PCR.**

El XL-PCR, es un tipo especial de PCR denominado así por el gran tamaño de segmento de ADN a amplificar, normalmente se replican segmentos de cerca de 1 000 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.<sup>36, 37,38</sup>

### **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 setiembre de 2013 a marzo de 2014.

#### **3.2 Definición de población y muestra**

**3.2.1 Población:** La población estuvo constituida por las personas que habitan en la ciudad de Ayacucho.

**3.2.2 Muestra:** La muestra estuvo conformada por seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (bolsa para descarte) de personas ayacuchanas donantes de sangre.

El material biológico fue ADN genómico de linfocitos humanos.

#### **3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos**

##### **3.3.1 Recolección e identificación de la muestra**

Las seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para descarte, se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, para la obtención del ADN genómico de linfocitos.



### **3.3.2 Obtención del ADN genómico de linfocitos humanos**

Se desarrolló con el siguiente protocolo modificado por Miranda.<sup>39</sup>

1. Se transfirió 1 ml de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 ml del tampón Tris- HCL 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37 °C.
2. Se homogenizó e incubó a 37 ° C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una micropipeta, dejando 1 ml del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió dos veces, el procedimientos 3 (esta vez con 5 ml de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7,7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.
5. Se adicionó 1 ml de centrifugado, 9 ml de solución salina (NaCl al 0,85%) se homogenizó y centrifugó a 2 500 rpm/ 10 minutos.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se resuspendió el paquete celular en 0,4 ml de la solución “high TE” (Tris-HCl50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM), luego se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
7. Se adicionó 0,4 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl10 mM) precalentada a 50 °C.
8. Se agregó 7 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó por una noche a 53 °C.
9. Luego se adicionó 750 µL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión, delicadamente durante 10 minutos.
10. Se instaló el tubo en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 rpm para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 ml.

11. A la fase acuosa, se adicionó 750  $\mu\text{L}$  de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
12. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5,2; en cantidad de 20  $\mu\text{L}$ .
13. Se agregó 600  $\mu\text{L}$  de alcohol isopropílico helado y dejó en reposo por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14 000 rpm.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y enjuagó el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
15. Se centrifugó nuevamente por 10 min a 14 000 rpm. Eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 80  $\mu\text{L}$  de la solución "low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera a 4°C.

### **3.3.3 Cuantificación de ADN genómico de linfocito humano extraído**

#### **3.3.3.1 Por espectrofotometría ultravioleta – Eppendorf BioPhotometer Plus, Absorbancia a 260 y 280 nm.**

Procedimiento:

1. Homogenizó las muestras de ADN con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ , manteniendo el tip dentro de la muestra, luego presionando y retrocediendo el pulsador lentamente de manera uniforme unas 20 veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf BioPhotometer Plus, con la opción de cuantificación de ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua PCR por un minuto y se absorbió el agua utilizando papel tissue.
4. Nuevamente se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua PCR sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de 10 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener "cero de Absorbancia" (0,00 A).

5. Se absorbió el agua utilizando papel tissue, luego se depositó 2  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación de ADN a 260A, proteínas a 280A y determinación de la pureza de ADN las que aparecen en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel "tissue".
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua PCR, se dejó por un minuto luego se secó con papel "tissue" y apagó el equipo.

### **3.3.3.2 Por electroforesis**

Procedimiento:

1. Se homogenizó las muestras de ADN con una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ , manteniendo el tip dentro de la muestra, luego presionando y retrocediendo el pulsador lentamente de manera uniforme unas 20 veces.
2. Se preparó el volumen de carga de cada una de las seis muestras con: muestra (4  $\mu\text{L}$ ) + loading (2  $\mu\text{L}$ ) + agua PCR (2  $\mu\text{L}$ ) = 8  $\mu\text{L}$ .
3. Se cargó todo el contenido de cada una de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa de 1%, para sus respectivos carriles.
4. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 80 voltios por 30 minutos.
5. Se coloreó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% por 10 minutos y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se visualizó 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; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN genómico obtenidos.

### **3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

#### **3.4.1. Pasos para la reacción en cadena de la polimerasa.**

En un tubo eppendorf estéril de 2 ml se preparó la mezcla para PCR "mix PCR", agregando los componentes de cada fórmula planteada para el presente estudio en el siguiente orden: agua PCR (NFW), Buffer, MgSO<sub>4</sub>, dNTPs, Primer Fw (forward) **5'CCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA3'**, Primer Rv (reverse) **5'GGCTGGGTCCCAGGTCATAC3'** y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix); se agitó el tubo del "mix" en un vórtex y se centrifugó ligeramente, luego se repartió el "mix" a cada tubo de PCR previamente rotulados, con el volumen correspondiente sin tomar en cuenta el volumen del ADN molde.

Se retiraron estos tubos de PCR fuera de la cabina de pre-PCR, y en la mesa de trabajo se agregó el ADN molde respectivo a 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.

#### **3.4.2. Detección de los amplicones del gen CYP2D6.**

Se detectaron los productos del XL-PCR con cada una de las condiciones físicas y químicas ensayadas, fueron corridas por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 80 voltios durante 30 minutos, luego los geles de agarosa se tñieron con bromuro de etidio al 1%. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y captadas en un sistema de digitalización de imágenes.

#### **3.4.3 Amplificación de fragmento del gen CYP2D6, mediante XL- PCR con 50ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50μL, conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO<sub>4</sub> 1,0 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,3 μM, primer Rv 0,3 μM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,0 U. Concentración final de ADN molde 50 ng/μL.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 62,4°C por 30 s y 70°C por 75 s, seguidos por 2 min a 70°C para la extensión final.

#### **3.4.4 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR con 100ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50 μL, conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO<sub>4</sub> 1,0 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,3 μM, primer Rv 0,3 μM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,0 U. Concentración final de ADN molde 100 ng/μL.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 62,4°C por 30 s y 70°C por 75 s, seguidos por 2 min a 70°C para la extensión final.

#### **3.4.5 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR a diferentes concentraciones de Primer.**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50 μL, conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, MgSO<sub>4</sub> 1,0 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,0 U. Concentración final de ADN molde 100 ng/μL.

Las concentraciones de cada iniciador fueron: 0,15 μM; 0,2 μM; 0,25 μM; 0,3 μM y 0,5 μM.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 62,4°C por 30 s y 70°C por 3 min, seguidos por 5 min a 70°C para la extensión final.

#### **3.4.6 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR a diferentes concentraciones de KOD Polimerasa.**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X,  $\text{MgSO}_4$  1,0 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,5  $\mu\text{M}$ , primer Rv 0,5  $\mu\text{M}$  y concentración final de ADN molde 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Las concentraciones de KOD polimerasa (High Fidelity Platinum) fueron: 1,5 U; 2,0 U y 3,0 U.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 62,4°C por 45 s y 70°C por 2 min, seguidos por 10 min a 70°C para la extensión final.

#### **3.4.7 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR con gradiente de temperatura de hibridación.**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X,  $\text{MgSO}_4$  1,0 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,5  $\mu\text{M}$ , primer Rv 0,5  $\mu\text{M}$  y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,5 U. Concentración final de ADN molde 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Las temperaturas de hibridación (Th) fueron: 63,3°C; 63,8°C; 64,3°C; 65,0°C y 65,6°C.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, Th por 45 s y 70°C por 2 min, seguidos por 10 min a 70°C para la extensión final.

#### **3.4.8 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR P a diferentes concentraciones de $\text{MgSO}_4$ .**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,5  $\mu\text{M}$ , primer Rv 0,5  $\mu\text{M}$  y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,5 U. Concentración final de ADN molde 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Las concentraciones de  $\text{MgSO}_4$  fueron 0,0 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM y 3,5 mM.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización 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.

#### **3.4.9 Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR para la reproducibilidad**

Se preparó el "mix" para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo las siguientes concentraciones finales: buffer 1X,  $\text{MgSO}_4$  1,5 mM, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, primer Fw 0,5  $\mu\text{M}$ , primer Rv 0,5  $\mu\text{M}$  y KOD polimerasa (Hot Start Master Mix) 1,5 U. Concentración final de ADN molde 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización 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.

#### **3.5. Interpretación de los resultados.**

Se procedió a interpretar los registros fotográficos, del gel de agarosa conteniendo los productos de amplificación de un fragmento del gen *CYP2D6*, a razón de la presencia, ausencia e intensidad de las bandas de ácidos nucleicos.

#### IV. RESULTADOS

Tabla 2. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta – Eppendorf BioPhotometer Plus, con absorbancia a 260 y 280 nm, de ADN genómico extraído de linfocitos humano.

Muestra	Concentración ADN µg/mL	ADN	PROTEINAS	PUREZA DE ADN
		A 260	A 280	A 260/A 280
1	1067,6	0,427	0,215	1,98
2	1125,6	0,450	0,219	2,05
3	1294,6	0,518	0,285	1,82
4	1288,5	0,515	0,250	2,06
5	688,7	0,275	0,152	1,81
6	622,6	0,295	0,60	1,84

Leyenda:

A 260 : Absorbancia a 260 nm de longitud de onda.

A 280 : Absorbancia a 280 nm de longitud de onda.



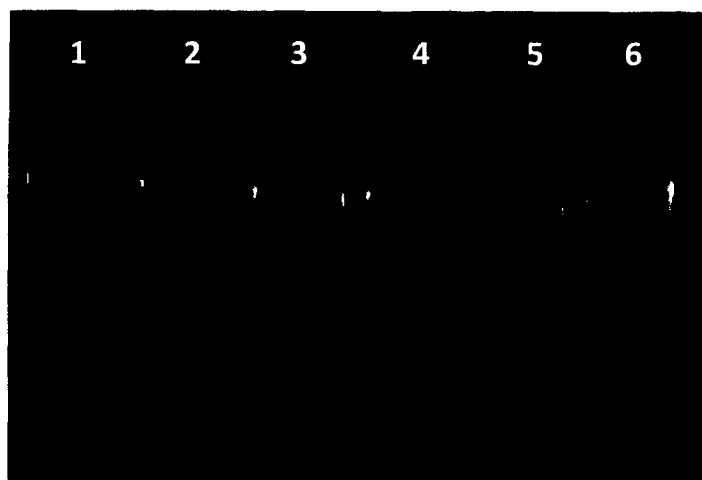


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,0% de seis muestras ADN genómico extraído de linfocitos humano.

Leyenda:

Carril 1: ADN de la bolsa colectora N° 1.

Carril 2: ADN de la bolsa colectora N° 2.

Carril 3: ADN de la bolsa colectora N° 3.

Carril 4: ADN de la bolsa colectora N° 4.

Carril 5: ADN de la bolsa colectora N° 5.

Carril 6: ADN de la bolsa colectora N° 6.

Volumen de carga: Muestra (4  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L) + agua PCR (2  $\mu$ L) = 8  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 minutos.

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

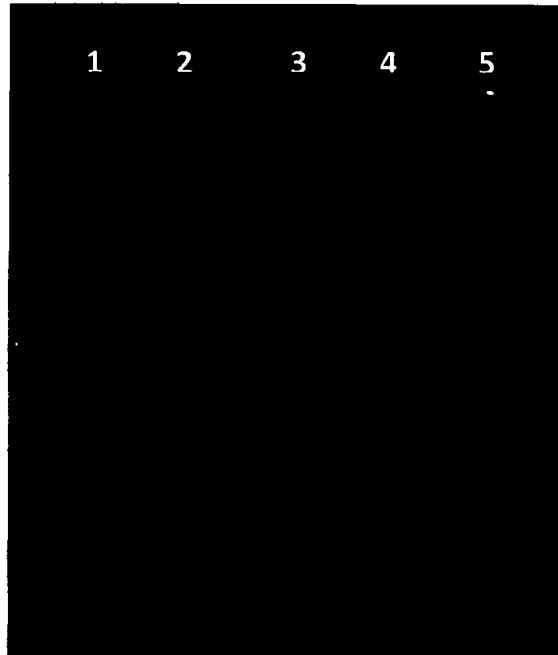


Figura 2: Productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* con 50 ng y 100 ng de ADN genómico de linfocitos humano, en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 3. Leyenda de la figura 2:

CONCENTRACIÓN DE COMPONENTE	CARRILES DEL GEL DE AGAROSA				
	1	2	3	4	5
ADN "molde" (ng)	50,0	50,0	100,0	100,0	0,0

Volumen de carga: Muestra (4  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L) y agua PCR (2  $\mu$ L) = 8  $\mu$ L

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 1 hora.

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

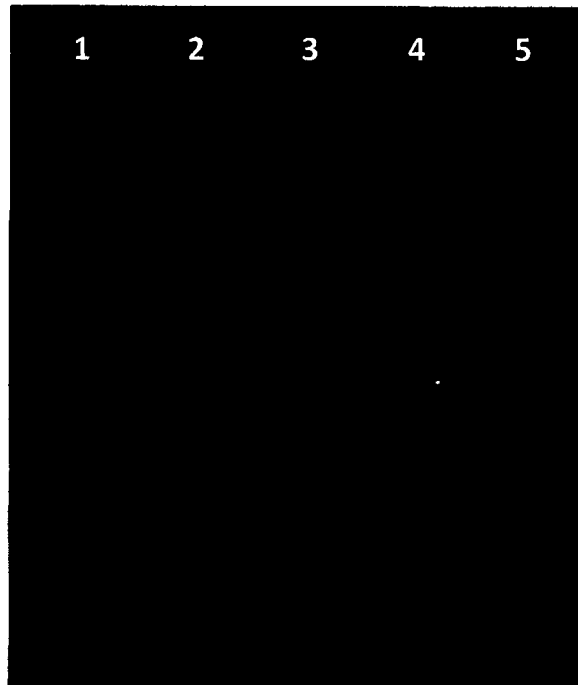


Figura 3: Productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano con diferentes concentraciones de "primer", en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 4. Leyenda de la figura 3:

CONCENTRACIÓN DE COMPONENTE	CARRILES DEL GEL DE AGAROSA				
	1	2	3	4	5
Primer ( $\mu\text{M}$ )	0,15	0,2	0,25	0,3	0,5

Volumen de carga: Muestra (15  $\mu\text{L}$ ) + loading (2  $\mu\text{L}$ ) = 17  $\mu\text{L}$   
 Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 min.  
 Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% por 10 minutos.



Figura 4: Productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano con diferentes concentraciones de KOD Polimerasa, en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 5. Leyenda de la figura 4:

COCENTRACIÓN DE COMPONENTE	CARRILES DEL GEL DE AGAROSA			
	1	2	3	4
KOD Polimerasa (U)	1,5	2,0	3,0	0,0

Volumen de carga: Muestra (15  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L) = 17  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 min.

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

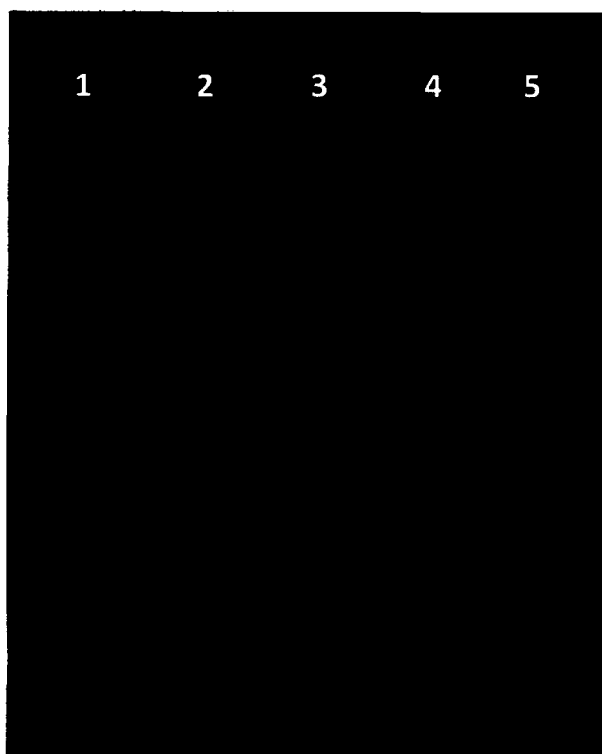


Figura 5: Productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano, con gradiente de temperatura de hibridación, en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 6. Leyenda de la figura 5:

GRADIENTE DEL COMPONENTE	CARRILES DEL GEL DE AGAROSA				
	1	2	3	4	5
Temperatura (°C)	63,3	63,8	64,3	65,0	65,6

Volumen de carga: Muestra (15  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L)= 17  $\mu$ L

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 min.

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

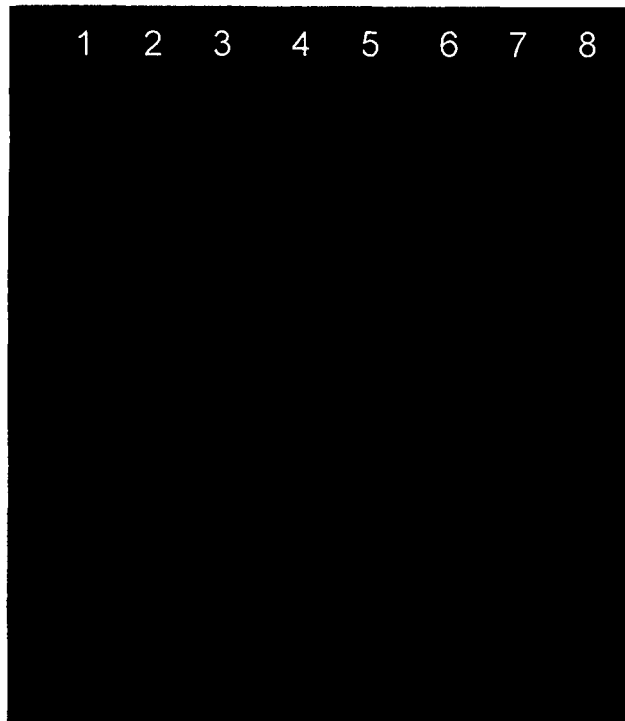


Figura 6: Productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano, con diferentes concentraciones de  $MgSO_4$ , en gel de agarosa al 1,5%.

Tabla 7. Leyenda de la figura 6:

CONCENTRACIÓN DE COMPONENTE	CARRILES DEL GEL DE AGAROSA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>MgSO<sub>4</sub> (mM)</b>	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5

Volumen de carga: Muestra (15  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L)= 17  $\mu$ L  
 Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 min.  
 Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% por 10 minutos.

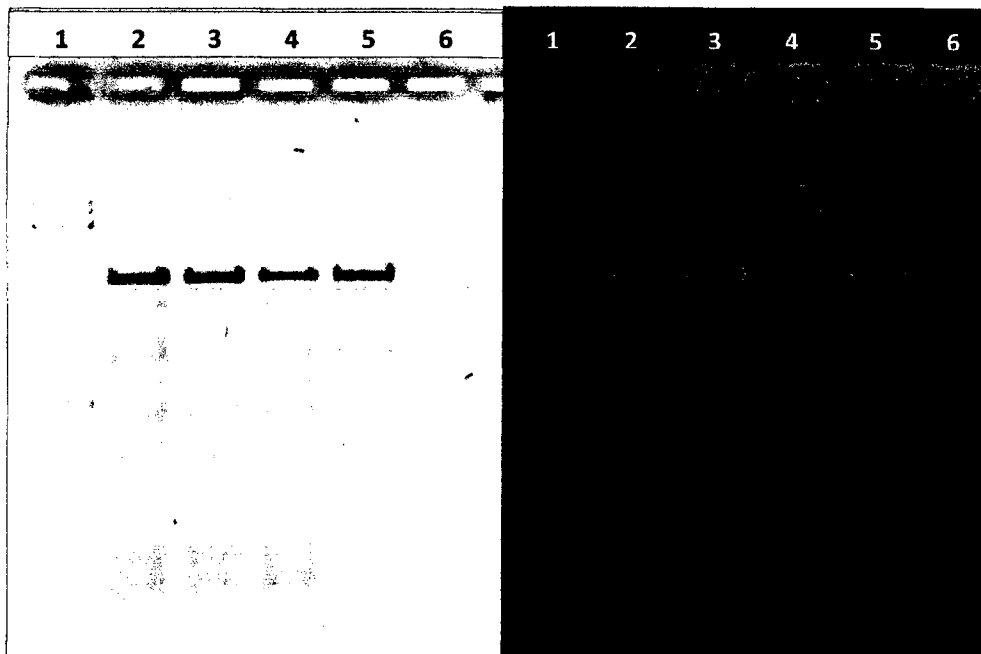


Figura 7: Reproducibilidad de la técnica de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano, con las concentraciones y volúmenes de los componentes estandarizados, en gel de agarosa al 1,5%.

**Leyenda:**

Carril 1: Marcador de tamaño molecular, Ladder 1 Kb

Carriles 2, 3, 4 y 5: Productos del XL-PCR.

Carril 6: Blanco, sin ADN molde.

Volumen de carga: Muestra (15  $\mu$ L) + loading (2  $\mu$ L) = 17  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 30 min.

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

## V. DISCUSION

Las concentraciones de ADN genómico de linfocitos humanos, cuantificados con espectrofotómetro UV marca Eppendorf BioPhotometer plus, según la tabla 2, extraídos de seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos; los valores obtenidos fueron de 622,6 µg/mL a 1294,6 µg/mL y la relación entre las medidas de A 260 y A 280 proporciona un estimado de la pureza de todas las muestras obtenidas, dentro del rango de 1,8 a 2,0; estos resultados reflejan la eficiencia del protocolo de extracción de ADN utilizado, pues en todas las muestras procesadas se obtuvo ADN con concentración y pureza que garantizó el desarrollo de la estandarización del  $\lambda$ L- PCR<sup>40,41</sup>.

La figura 1 de la electroforesis en gel de agarosa al 1,0% de seis muestras de ADN genómico extraído de linfocito humano, nos permite visualizar su presencia gracias a la refringencia del bromuro de etidio intercalado entre los ácidos nucleicos, revelando la relación directa de la concentración del ADN con la intensidad de la refringencia<sup>39</sup>, por efecto de la incidencia de los rayos ultra violeta; estas observaciones cualitativas, concuerdan con las cifras cuantitativas determinadas por espectrofotometría presentadas en la tabla 2.



La figura 2, representa el primer ensayo realizado para la estandarización de XL-PCR del gen *CYP2D6*, tomando como "ADN molde" las concentraciones de 50 ng y 100 ng de ADN genómico de linfocitos humanos, cada uno de ellos por duplicado; los carriles 1 y 2 con ADN a 50 ng muestran sus productos esparcidos en la trayectoria del carril, con fragmentos de diversos tamaños, reflejando una reacción inespecífica, probablemente por la poca cantidad de "ADN molde", mientras que en los carriles 3 y 4 con ADN a 100 ng, muestra sus productos con una serie de bandas algo definidas en escalera, revelando que para el XL-PCR es necesario incorporar en el "mix" concentraciones de "ADN molde" de 100 ng<sup>42</sup>, cada vez que el producto de amplificación es bastante grande de aproximadamente 2 900 pb. El carril cinco no manifiesta ningún producto de la reacción, es el "blanco" sin "ADN molde", señalando que los reactivos del "mix" no están contaminados y funcionan, siempre y cuando cuenten con "ADN molde".

La figura 3, muestra el ensayo de amplificación del gen *CYP2D6* con 100 ng de ADN genómico de linfocitos humanos como molde, a diferentes concentraciones de "primer" 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 y 0,5 en gel de agarosa al 1,5%; las bandas productos del XL-PCR, aparecen paulatinamente a como aumenta la concentración de primer, siendo notorio a partir de 0,2  $\mu\text{M}$ , los carriles 3 y 4 muestran bandas bien definidas, pero diversas; mientras que en el carril cinco aparece bandas que se aproximan al tamaño del producto buscado de 2 900 pb, evidenciando que la concentración apropiada de los primer para la amplificación de éste segmento de ADN debe ser a 0,5  $\mu\text{M}$ <sup>18</sup>. Todas estas condiciones físicas y químicas fueron modificadas sistemáticamente para optimizar la concentración adecuada de los iniciadores.

La figura 4 expone los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* con diferentes concentraciones de KOD Polimerasa y 100 ng de ADN genómico de linfocitos humanos como molde, en gel de agarosa al 1,5%; Los tres carriles, que representan a cada concentración de la enzima, muestran sus productos de amplificación; el carril uno con bandas a suficiente concentración y refringencia para evidenciarlo, mientras que los carriles 2 y 3, aún cuando las bandas son más refringentes, hay una mayor amplificación de segmentos inespecíficos, que puede deberse al exceso de KOD polimerasa presente en el sistema, que estaría reaccionando de manera inespecífica, por la elevada concentración de ésta enzima. Por estas razones consideramos que la concentración adecuada para esta reacción fue de 1,5 U<sup>18</sup>.

El carril cinco no muestra ninguna banda porque es el tubo "blanco" sin "ADN molde", para garantizar que los reactivos del sistema no están contaminados con ADN foráneo.

La figura 5 de gel de agarosa al 1,5%, presenta los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humanos, con gradientes de cinco temperaturas de hibridación 63,3; 63,8; 64,3; 65,0 y 65,6 °C; este ensayo se realizó para determinar la temperatura adecuada de hibridación y obtener una máxima eficiencia en la amplificación de la reacción. Como podemos observar en los carriles 1, 2 y 3 genera una banda de 2 900 pb muy nítida, pero acompañada de otras inespecíficas, debido a que esas temperaturas están permitiendo que los primer puedan pegarse a otros destinos inespecíficos, mientras en los carriles 4 y 5 presentan una sola banda visible del tamaño de 2 900 pb, pero el carril cuatro tiene una banda más concentrada y refringente, por tanto la temperatura de hibridación eficiente para esta reacción de XL-PCR es de 65,0 °C. En el trabajo de investigación realizado por Dorado y col., especifica que la temperatura óptima es de 62,4 °C<sup>18</sup>; sin embargo en el proceso de la

estandarización, la temperatura óptima fue 65°C, esta variación probablemente se debe a condiciones ambientales que varía de un lugar a otro.

La figura 6 muestra los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humanos, procesados con diferentes concentraciones de MgSO<sub>4</sub>, en gel de agarosa al 1,5%. El carril uno corresponde al blanco en la que no muestra ningún producto, pero indica que los reactivos no están contaminados y que el sistema no funciona sin MgSO<sub>4</sub>, los carriles 3 a 8 presentan mayor número de bandas que el carril dos, debido a que éste último se desarrolló con baja concentración de MgSO<sub>4</sub> (0,5 mM), sin embargo el carril cuatro muestra una banda claramente distinta a las demás, con una fuerte refringencia que indica mayor concentración del producto amplificado, que corresponde al segmento del *CYP2D6* con 2 900 pb, por tanto la concentración a 1,5 mM es la adecuada para optimizar el XL-PCR y visualizar una banda bien nítida, sobre todo cuando hay productos inespecíficos en la reacción. Este resultado concuerda con Dorado y col.<sup>18</sup>

En la figura 7. Muestra los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humanos, procesados con las diferentes concentraciones y volúmenes estandarizados, obtenidos de los resultados anteriores, en el carril 1, 2 y 3 revela la presencia de ADN a 2 900 pb y el carril cuatro es el blanco, sin ADN molde. Con ello obtenemos el protocolo final de la estandarización del gen *CYP2D6*, con el cual se realizaran investigaciones como el proyecto de investigación regional: caracterización molecular alélicas de los genes *CYP2D6*, *CYP2C9* y *CYP2C19* en poblaciones nativas y mestiza de Ayacucho – Perú; y demás investigaciones a nivel regional.

## VI. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir de ADN genómico de linfocito humano.
- Se logró obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de linfocito humano mediante extracción orgánica hasta una concentración de 1 294,6 µg/mL, y pureza de 1,82.
- 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, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, desoxirribonucleósidos 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 100 ng/µL; 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.

## VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar las muestras poblacionales e incluir más regiones del Perú, a fin de conocer con mayor precisión el carácter genético *CYP2D6* como de otros genes de implicancia clínica.
- Realizar la genotipificación para determinar los diferentes polimorfismos del gen *CYP2D6*, en diferentes poblaciones humanas y personas que se encuentren en tratamiento con antidepresivos, antipsicóticos, neurolépticos, antituberculosis, etc.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodman y Gilman, 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Edit. Mc Graw Hill Interamericana – México.
2. Macarena Celina Cáceres León. Farmacoepidemiología y farmacogenética de la esquizofrenia: Centro de Investigación Clínica del Área de Salud de Badajoz CICAB. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz. SES [revista en internet]. 2006 [acceso Abril de 2014] Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
3. Benny K. Abraham, C. Adithan. Genetic Polymorphism of CYP2D6: Indian Journal of Pharmacology. EducationalForum. [revista en internet]. 2001 [acceso Abril de 2014] Disponible: en <http://medind.nic.in/ibi/t01/i3/ibit01i3p147.pdf>.
4. 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>
5. Mendoza R, Wan Y, Poland R, Smith M, Zheng Y, Berman N. polymorphism in a Mexican American population. [revista en internet]. 2001. [acceso Abril de 2014] Disponible: en: <http://www.nature.com/clpt/journal/v70/n6/full/clpt2001136a.html>
6. 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 DrugMetabPharmacokinet. [revista en internet]. 1996 [acceso Abril de 2014] Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
7. Cohen BM, Sommer BR. Metabolism of thioridazine in the elderly. J ClinPsychopharmacol.[revista en internet].1988. [acceso Abril de 2014] Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
8. Shah, RR. Aspectos Farmacogenéticos de la Torsade de Pointes Inducida por Drogas. [revista en internet]. 2004. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/farmaweb181.htm>.
9. Szórády I, Sánta A. Drug hydroxylator phenotype in Hungary. Eur J ClinPharmacol. [revista en internet]. 1987. [acceso Abril de 2014]Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
10. LLerena A, Berecz R, de la Rubia A, Dorado P. QTc interval lengthening is related to CYP2D6 hydroxylation capacity and plasma concentration of thioridazine in patients. JPsychopharmacol. [revista en internet]. 2002. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788477238133.pdf>.
11. Amàlia Lafuente Flo. Actualización. Bases genéticas de la esquizofrenia. IDIBAPS. Barcelona. CIBER-SAM, España. [revista en internet]. 2009. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: [http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1722/25/00250031\\_LR.pdf](http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1722/25/00250031_LR.pdf).

12. Anna CrescentiSavall. Estudio de la relación de los polimorfismos en los genes ECA, CMT y CYP2D6 con el riesgo de desarrollar síntomas extrapiramidales por antipsicóticos y el riesgo de esquizofrenia. Universidad de Barcelona. [revista en internet]. 2007. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en:[http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1634/AMCS\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1634/AMCS_TESIS.pdf?sequence=1).
13. Chen C.H., Hung C.C., Wei F.C., Koong F.J. Debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) genetic polymorphisms and susceptibility to schizophrenia in Chinese patients from Taiwan. *Psychiatr. Genet.* 2001.m[acceso Abril de 2014]. Disponible: en: [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1634/AMCS\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1634/AMCS_TESIS.pdf?sequence=1).
14. Bouchardy C, Benhamou S, Dayer P. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cáncer Res.* [revista en internet]. 1996. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: [dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/358.pdf](http://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/358.pdf).
15. Chandra G, Selvaraj P, Reetha Am yNarayanan Pr. BamH1 polymorphism of human cytochrome P450 gene, CYP2D6, in quiescent a d relapse patients of pulmonary tuberculosis. *Biomedicine, India.* [revista en internet]. 2003. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://eprints.nirt.res.in/597/1/200303.pdf>.
16. 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>
17. Rodríguez A, Garcia J, Martínez M Y Conesa Z. Papel del citocromo P450 en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antihipertensivos. [revista en internet]. 2010. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130634310002205><http://www.aulamedica.es/gdcr/index.php/fh/article/download/354/354>
18. 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. [revista en internet] 2005. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://zl.elsevier.es/es/revista/medicina-clinica-2/estudio-farmacogenetico-polimorfismo-metabolico-debrisoquina-cyp2d6-poblacion-13106328-brief-reports-2007><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775307727240>
19. Esther Machín García; Fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, genotipos CYP2D6 y CYP2C9 en la población ecuatoriana respecto de la española. Universidad de Extremadura. [revista en internet] 2012. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: [http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/420/TDUEX\\_2012\\_Mach%C3%ADn\\_Garc%C3%ADa.pdf?sequence=1](http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/420/TDUEX_2012_Mach%C3%ADn_Garc%C3%ADa.pdf?sequence=1)
20. Lay Kek Teh, y Leif Bertilsson. Farmacogenómica de CYP2D6: Genética Molecular, Diferencias interétnicas e importancia clínica. *Pharmacogenomics*

- Centre (PROMISE), Faculty of Pharmacy, Universiti Teknologi MARA, Malaysia. [revista en internet] 2012. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://www.gbcbiotech.com/farmacogenomica/images/acervo/Farmacogenes/Pharmacogenomics%20of%20CYP2D6%20-%20molecular%20genetics%20interethnic%20differences%20and%20clinical%20importance.pdf>.
21. Jennifer M Skierka, Denise L Walker, Sandra E Peterson, Dennis J O'Kane y John Logan Black. CYP2D6\*11 and challenges in clinical genotyping of the highly polymorphic CYP2D6 gene. [revista en internet] 2012. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/pgs.12.56?journalCode=pgs&>.
  22. Christine M Walko y Howard McLeod. Use of CYP2D6 genotyping in practice: tamoxifen dose adjustment. [revista en internet] 2012. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/pgs.12.27>.
  23. José Luis Salcedo Lagullón; Estudio del efecto de tres dosis de Tamoxifeno Sobre la concentración plasmática de endoxifeno en pacientes con cáncer de mama hormonodependiente portadoras de un genotipo de CYP2D6, metabolizador lento. Universidad de Granada. España. [revista en internet] 2012. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/21459824.pdf>.
  24. Ana Fernández-Santander, Armando Tejerina Gómez, Antonio Tejerina Bernal, Félix Gómez-Gallego, Catalina Santiago Dorrego, Fernando Bandrés Moya. Aspectos farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de mama con Tamoxifeno. [revista en internet] 2007. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en [www.instituto-roche.es/web/pdf/2008/tamoxife.pdf](http://www.instituto-roche.es/web/pdf/2008/tamoxife.pdf)?
  25. Goodman and Gilman's. 2006. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11ª ed. McGraw-Hill.
  26. Ignacio Andrés Arribas; 2010. Farmacogenética y Variabilidad Interindividual en la Respuesta a los Medicamentos. Edita: Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. España.
  27. Ferriols Lisart R; Ochoa Aranda E; Nebot García J; Ferrer Magdalena T; Alós Almiñana M; Influencia del genotipo CYP2D6 en la farmacocinética del tamoxifeno en mujeres con cáncer de mama hormonodependiente. FarmHosp [revista en internet] 2009. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1128/1/T-ESPE-029615.pdf>.
  28. Antoni Sicras Mainar; Pablo Guijarro; Beatriz Armada, Milagrosa Blanca Tamayo; Ruth Navarro Artieda. Impacto de las combinaciones de medicamentos implicados en la ruta metabólica mediada por la isoenzima CYP2D6 en pacientes tratados con venlafaxina para el trastorno depresivo mayor: consecuencias clínicas y económicas. [revista en internet] 2010. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://www.aes.es/Jornadas2013/pdf/comunic/O-001.pdf>.
  29. Youn Ho Kim; Presencia de mutaciones en la región exónica 7 del gen CYP2D6 en poblaciones peruanas y su posible aplicación en la salud

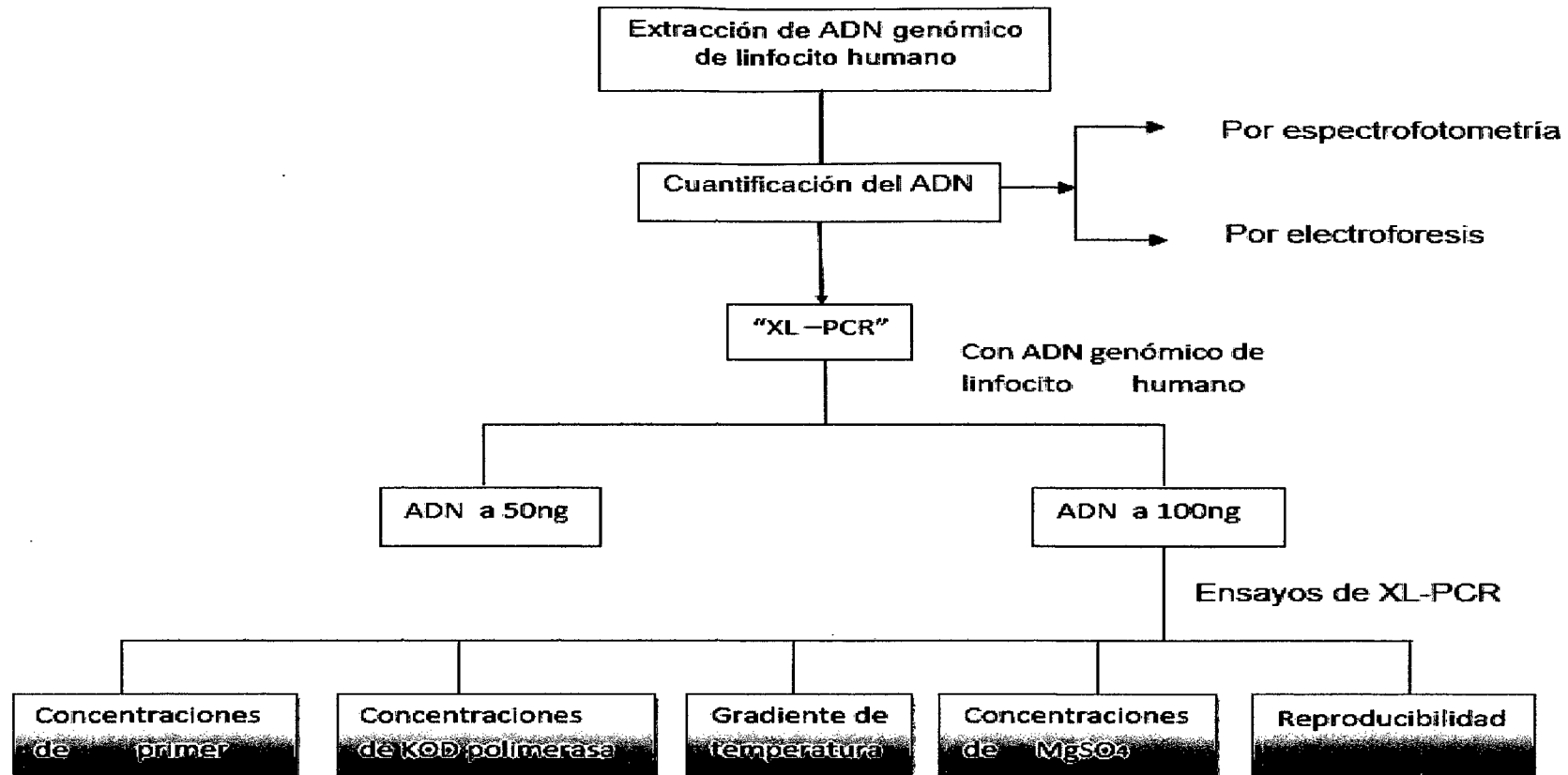


- pública. USMP Facultad de Medicina Humana. [revista en internet] 2014. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: [http://www.researchgate.net/profile/Alberto\\_Salazar2/publication/260084396\\_PRESENCIA\\_DE\\_MUTACIONES\\_EN\\_LA\\_REGIN\\_EXNICA\\_7\\_DEL\\_GEN\\_CYP2D6\\_EN\\_POBLACIONES\\_PERUANAS\\_Y\\_SU\\_POSIBLE\\_APLICACION\\_EN\\_LA\\_SALUD\\_PBLICA/file/6a85e52f6d463565c5.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Alberto_Salazar2/publication/260084396_PRESENCIA_DE_MUTACIONES_EN_LA_REGIN_EXNICA_7_DEL_GEN_CYP2D6_EN_POBLACIONES_PERUANAS_Y_SU_POSIBLE_APLICACION_EN_LA_SALUD_PBLICA/file/6a85e52f6d463565c5.pdf).
30. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: 1998.
  31. Llerena A, Cobaleda J, Martínez C, Benítez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. 1997.
  32. 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.
  33. 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. 2007.
  34. Bernard S, Neville K, Nguyen AT, Flockhart D. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP26 in the U.S.population.2006.
  35. 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.
  36. Menoyo A, Baiget M. Caracterización de variantes alélicas del citocromo CYP2D6 en una comunidad española. 2005.
  37. Heras G. Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen CYP2D6 del citocromo P450, en población sana del Ecuador. 2010.
  38. Gaedigk A, Bradford I, Marcucci K, Leeder J. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. 2002.
  39. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular:. Guía de Prácticas. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
  40. Natascha Weib, Foong Teng Lu, Arun Kumar. Eppendorf epT.I.P.S. @LoRetention – Comparison of low retention pipette tips via simple and fast absorbance measurements in the BioPhotometer™ plus. [revista en internet] 2009. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en: <http://online-shop.eppendorf.es/eshopdownload/download/2652>.
  41. Martin Armbrecht, Jennifer Oduro, Charité. Reproducible photometric determination of DNA concentrations using the Eppendorf UVette® in the Eppendorf BioPhotometer plus™[revista en internet] 2010. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en:<http://online-shop.eppendorf.es/eshopdownload/download/2654>.
  42. Llerena Ruiz, Adrián. Estandarización y validación del método de extracción en cadena de la polimerasa (PCR) para el estudio del polimorfismo del gen CYP2D6 en Colombia. [revista en internet] 2008. [acceso Abril de 2014]. Disponible: en:

[http://www.unex.es/investigacion/grupos/pretagu/estructura/tesis/pagina\\_tesis?listado\\_lineas=1&idtesis=5184](http://www.unex.es/investigacion/grupos/pretagu/estructura/tesis/pagina_tesis?listado_lineas=1&idtesis=5184).

## **ANEXOS**

## Anexo 1



Flujograma para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen *CYP2D6* a partir de ADN genómico de linfocito humano.

## Anexo 2



Figura 9. Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico de linfocitos humano.

### Anexo 3

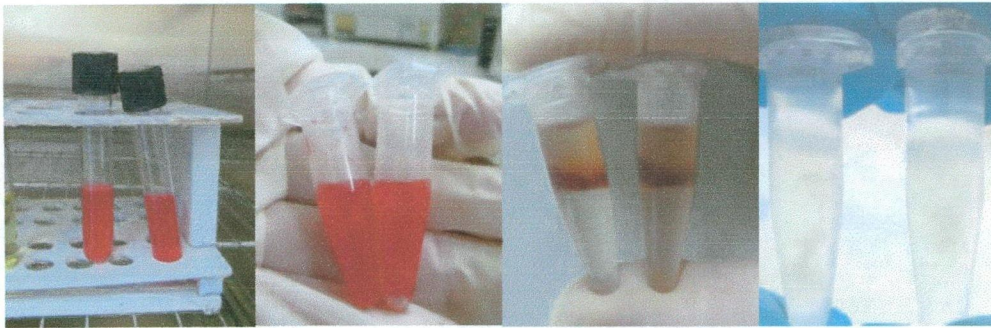


Figura 10. Extracción del ADN genómico de linfocitos humano.



Anexo 4

Figura 11. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta del ADN genómico de linfocitos humano extraído.

## Anexo 5



Figura 12. Cabina pre-PCR, preparación del “mix” para XL – PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano.



## Anexo 6



Figura 13. Programación del termociclador para la reacción XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano.

## Anexo 7



Figura 14. Preparación del volumen de carga para electroforesis con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano.

## Anexo 8

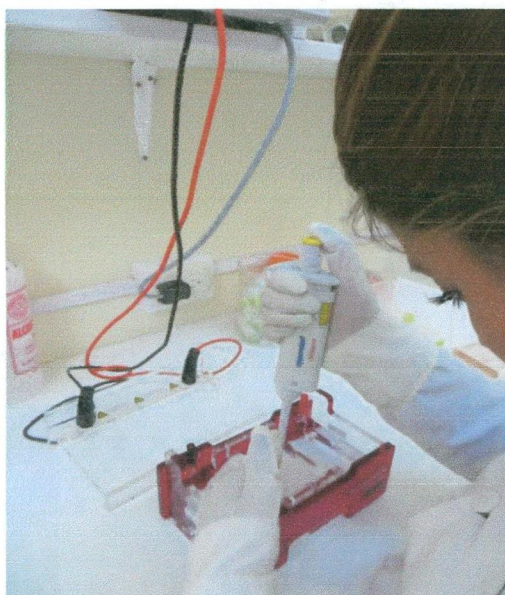


Figura 15. Sembrando los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano en la cámara de electroforesis.

## Anexo 9



Figura 16. Coloración del gel de agarosa conteniendo los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano, con bromuro de etidio al 1,0 %.



## Anexo 10



Figura 17. Sistema de registrador de imágenes Biometra *UV solo TS* del gel de agarosa con los productos de XL-PCR del gen *CYP2D6* de ADN genómico de linfocitos humano.

## Anexo 11

**Tabla 8. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR con 50ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.**

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(μL)	2 Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	10,0
MgSO4	25 mM	1,0 mM	2,0	4,0
dNTP's	2.5 mM	0,2mM	5,0	10,0
Primer Fw	10 uM	0,3 uM	1,5	3,0
Primer Rv	10 uM	0,3 uM	1,5	3,0
KOD polimerasa	1 U/UI	1,0 U	1,0	2,0
<b>ADN molde</b>			<b>2,5</b>	<b>5,0</b>
H2O PCR			31.5	63.0
TOTAL			<b>50.0</b>	<b>100.0</b>

<b>Programa XL-PCR</b>	Desnaturalización Inicial		95°C x 2min
	30 Ciclos	Desnaturalización	95°C x 30s
		Hibridación	62.4°C x 30s
		Extensión	70°C x 75s
	Extensión Final		70°C x 2min
		-	4°C

## Anexo 12

**Tabla 9. Amplificación de fragmento del gen CYP2D6, mediante XL- PCR con 100ng/μL de ADN genómico de linfocito humano.**

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen CYP2D6				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx(μL)	2 Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	10,0
MgSO4	25 mM	1,0 mM	2,0	4,0
dNTP's	2.5 mM	0,2mM	5,0	10,0
Primer Fw	10 uM	0,3 uM	1,5	3,0
Primer Rv	10 uM	0,3 uM	1,5	3,0
KOD polimerasa	1 U/UI	1,0 U	1,0	2,0
<b>ADN molde</b>			<b>5,0</b>	<b>10,0</b>
H2O PCR			29,0	58,0
<b>TOTAL</b>			<b>50,0</b>	<b>100,0</b>

<b>Programa XL-PCR</b>	Desnaturalización	Inicial	95°C x 2min
	30 Ciclos	Desnaturalización	95°C x 30's
		Hibridación	62.4°C x 30s
		Extensión	70°C x 75s
	Extensión	Final	70°C x 2min
		-	4°C



### Anexo 13

Tabla 9. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de Primer.

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>							
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	0,15 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M
PCR Buffer	10x	1x	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgSO4	25 mM	1,0 mM	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
dNTP's	2,5 mM	0,2mM	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Primer Fw	10 $\mu$ M		0,75	1,0	1,25	1,5	2,5
Primer Rv	10 $\mu$ M		0,75	1,0	1,25	1,5	2,5
KOD polimerasa	1 U/UI	1,0 U	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5
ADN molde			5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
H2O PCR			29,0	29,5	29,0	28,5	26,5
TOTAL			50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Programa XL-PCR	Desnaturalización Inicial		95°C x 2min
	30 Ciclos	Desnaturalización	95°C x 30s
		Hibridación	62.4°C x 30s
		Extensión	70°C x 3min
	Extensión Final	-	70°C x 5min
			4°C



## Anexo 14

Tabla 11. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL-PCR a diferentes concentraciones de KOD polimerasa (Hot Start Master Mix).

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>					
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1.5 U	2.0 U	3.0 U
PCR Buffer	10x	1x	5,0	5,0	5,0
MgSO4	25 mM	1,0 mM	2,0	2,0	2,0
dNTP's	2,5 mM	0,2mM	5,0	5,0	5,0
Primer Fw	10 uM	0,5 uM	2,5	2,5	2,5
Primer Rv	10 uM	0,5 uM	2,5	2,5	2,5
KOD polimerasa	1 U/UI		1,5	2,0	3,0
ADN molde			5,0	5,0	5,0
H2O PCR			26,5	26,0	25,0
TOTAL			50,0	50,0	50,0

Programa XL-PCR	Desnaturalización Inicial		95°C x 5min
	35 Ciclos	Desnaturalización	95°C x 30s
		Hibridación	62.4°C x 45s
		Extensión	70°C x 2min
	Extensión Final		70°C x 10min
		-	4°C

## Anexo 15

Tabla 12. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL-PCR con gradiente de temperatura de hibridación.

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx (μL)	5Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	25,0
MgSO4	25 mM	1,5 mM	3,0	15,0
dNTP's	2,5 mM	0,2mM	5,0	25,0
Primer Fw	10 μM	0,5 μM	2,5	12,5
Primer Rv	10 μM	0,5 μM	2,5	12,5
KOD Polimerasa	1 U/UI	1,5 U	1,5	7,5
H2O PCR			5,0	25,0
NFW			25,5	127,5
TOTAL			50,0	250,0

Programa XL-PCR	Desnaturalización Inicial		95°C x 5min
	35 Ciclos	Desnaturalización	95°C x 30s
		Hibridación (63,0; 65,0)	---°C x 45s
		Extensión	70°C x 2min
	Extensión Final		70°C x 10min
		-	4°C



Anexo 16

Tabla 13. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR P a diferentes concentraciones de MgSO<sub>4</sub>.

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>											
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	MgSO <sub>4</sub> 0,0 mM	MgSO <sub>4</sub> 0,5 mM	MgSO <sub>4</sub> 1,0 mM	MgSO <sub>4</sub> 1,5 mM	MgSO <sub>4</sub> 2,0 mM	MgSO <sub>4</sub> 2,5mM	MgSO <sub>4</sub> 3,0mM	MgSO <sub>4</sub> 3,5mM	
PCR Buffer	10x	1x	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
MgSO <sub>4</sub>	25 mM		0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	
dNTP's	2,5 mM	0,2mM	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Primer Fw	10 μM	0,5 μM	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
Primer Rv	10 μM	0,5 μM	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
KOD polimerasa	1 U/UI	1,0 U	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
ADN molde			5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
H <sub>2</sub> O PCR			28,5	27,5	26,5	25,5	24,5	23,5	22,5	21,5	
TOTAL			50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	

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

## Anexo 17

**Tabla 14. Amplificación de fragmento del gen *CYP2D6*, mediante XL- PCR para la reproducibilidad**

Preparación del "mix" para amplificación de fragmento del gen <i>CYP2D6</i>				
REACTIVOS	[Inicial]	[Final]	1 Rx (μL)	4Rx(μL)
PCR Buffer	10x	1x	5,0	20,0
MgSO4	25 mM	1,5 mM	3,0	12,0
dNTP's	2,5 mM	0,2mM	5,0	20,0
Primer Fw	10 μM	0,5μM	2,5	10,0
Primer Rv	10 μM	0,5μM	2,5	10,0
KOD polimersa	1 U/UI	1,5 U	1,5	6,0
ADN molde			5,0	40,0
H2O PCR			25,5	102,0
<b>TOTAL</b>			<b>50,0</b>	<b>200,0</b>

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

### Anexo 18

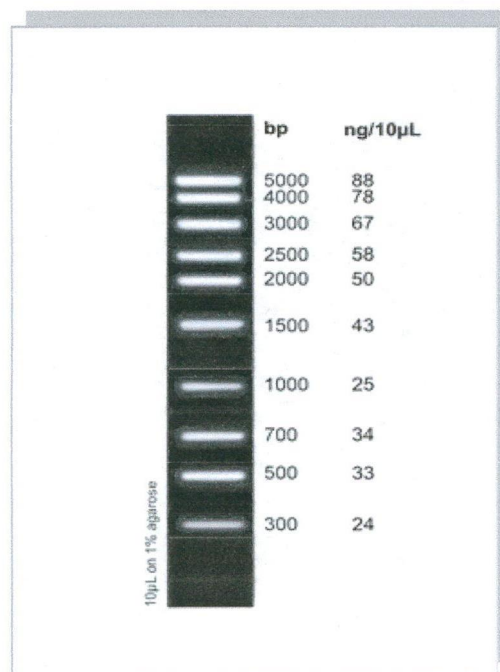


Figura 18. Escala del marcador tamaño de fragmentos de ADN del "ladder 1 kb"



Anexo 19

Tabla 15. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen <i>CYP2D6</i> a partir de linfocito humano. Ayacucho, 2013.	¿Cuáles serán las condiciones físicas y químicas para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR del gen <i>CYP2D6</i> a partir de linfocito humano. Ayacucho, 2013?	<p>GENERAL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para el gen <i>CYP2D6</i> a partir de ADN genómico de linfocito humano.</li> </ul> <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) de linfocito humano mediante extracción orgánica.</li> <li>Determinar las condiciones físicas y químicas de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR para amplificar el gen <i>CYP2D6</i>.</li> </ul>	<p>-Aspectos teóricos de Gen <i>CYP2D6</i>, fenotipos metabolizadores.</p> <p>-Reacción en cadena de la polimerasa.XL-PCR.</p>	Las condiciones físicas y químicas estandarizadas de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR permiten amplificar el gen <i>CYP2D6</i> a partir de ADN genómico de linfocito humano. Ayacucho, 2013.	<p><b>Variable Principal:</b> El gen <i>CYP2D6</i> a partir de ADN genómico de linfocito humano.</p> <p><b>Indicador:</b> - Concentraciones de la muestra biológica y de ADN humano.</p> <p><b>Variable secundaria:</b> Las condiciones físicas y químicas estandarizadas de la reacción en cadena de la polimerasa XL-PCR.</p> <p><b>Indicador:</b> Temperaturas de reacción y concentraciones de los componentes de XL-PCR.</p>	<p><b>Tipo de investigación :</b> Básica – descriptivo.</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Básico.</p> <p><b>Población:</b> La población estuvo constituido por las personas que habitan en la ciudad de Ayacucho.</p> <p><b>Muestra:</b> La muestra estuvo conformada por seis unidades de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, de personas ayacuchanas donantes de sangre, la misma que fue determinada a "juicio de expertos". El material biológico fue ADN genómico de linfocitos humanos.</p> <p><b>Diseño Experimental:</b> Los ensayos se realizan con un modelo <i>in vitro</i> para estandarizar la técnica XL-PCR a partir de ADN genómico de linfocito humano.</p> <p><b>Análisis estadístico:</b> Los datos se presentan en tablas, registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. La estandarización de la técnica XL-PCR se evalúa mediante las diferentes concentraciones de sus componentes.</p>