

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**Polimorfismo del gen *CYP2C9* y fenotipo metabolizador  
de fenitoina en pacientes con epilepsia atendidos en el  
Hospital Regional "Miguel A. Mariscal Llerena",  
Ayacucho 2018.**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN SALUD PÚBLICA**

**Presentado por:  
MORENO HINOJOSA, Miriam**

**AYACUCHO – PERÚ  
2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme culminar una etapa más en el ámbito académico; además de su infinita bondad y misericordia, a mi esposo Gustavo y mis hijas Flavia e Irina, a mis padres y hermanos por su apoyo y cariño incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser nuestra *alma mater*, que nos acogió durante estos años de estudio y nos dio la oportunidad de adquirir conocimiento.

A la Escuela de Posgrado y Facultad de Ciencias de la Salud, por darnos la oportunidad de formarnos en la maestría.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática y al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, que me permitieron realizar el estudio.

Al Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho y a la Asociación de Epilépticos de Ayacucho en la persona de su presidenta la Sra. María Dolores Flores Ceyalaran que contribuyeron en la realización del presente estudio.

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y comprensión en cada etapa de mi vida.

A la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, al Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) del Departamento de Oncología Básico Clínico, en las personas del Dr. Luis Quiñones Sepúlveda y Dr. Nelson Varela Figueroa, por su aporte en la realización del presente estudio.

Al Dr. Homero Ango Aguilar por su asesoría y por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de Tesis.

A todas 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	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Epilepsia	8
2.2.1 Etiología de la epilepsia	10
2.2.2 Clasificación de las epilepsies	11
2.2.3 Epidemiología de la epilepsia	12
2.2.4 Fisiopatología de la epilepsia	15
2.3 Fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia	17
2.3.1 Difenil hidantoína o fenitoína	18
2.3.2 Metabolismo de la Fenitoína	19
2.3.3 Factores que intervienen en la respuesta al tratamiento farmacológico.	21
2.4 Polimorfismo de un gen	21
2.5 Citocromo P450	23
2.5.1 Enzima CYP2C9	25
2.6 PCR en tiempo real.	27
2.6.1 Sondas Taqman®.	27
2.6.2 Lectura e interpretación de los resultados de una PCR en tiempo real.	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Lugar de trabajo de investigación	30
3.2 Definición de población y muestra	30
3.2.1 Población	30
3.2.2 Muestra	31
3.3 Aspectos éticos	32
3.4 Diseño metodológico para la recolección de datos	32
3.4.1 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	32
3.4.2 Plan de procedimiento	33
Recolección de las muestras de sangre y obtención de paquete de glóbulos blancos.	33
Obtención de ADN genómico humano.	33
Cuantificación espectrofotométrica UV y determinación del volumen de carga de ADN genómico humano para	35

PCR-TR.		
Procesamiento del ADN genómico, para la	36	
identificación de los alelos.		
Sondas Taqman	36	
Condiciones para el PCR-TR	36	
Interpretación de los resultados del PCR-TR.	37	
3.5	Análisis de datos	38
IV.	RESULTADOS	39
V.	DISCUSIÓN	47
VI.	CONCLUSIONES	53
VII.	RECOMENDACIONES	54
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
IX.	ANEXOS	58

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Morbilidad general de epilepsia, en consulta externa, por subcategoría según CIE 10 año 2016.	14
Tabla 2	Morbilidad general de epilepsia, en consulta externa, por subcategoría según CIE 10 año 2017.	15
Tabla 3	Farmacocinética y datos generales de Fenitoína (DFH).	19
Tabla 4	Sondas utilizadas para la determinación del genotipo de <i>CYP2C9</i> (Applied Biosystems Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assay).	36
Tabla 5	Fórmula de la preparación del cocktail para PCR-TR.	36
Tabla 6	Tipos de fluorescencia y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en tiempo real.	37
Tabla 7	Cuantificación y pureza de ADN genómico humano mediante espectrofotometría ultra violeta – Eppendorf BioPhotometer Plus, y determinación del volumen de carga para PCR tiempo real, de 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	40
Tabla 8	Frecuencias alélicas y genotípicas del <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> en 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	45
Tabla 9	Determinación genotípica del gen <i>CYP2C9</i> para los alelos <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> ; y fenotipo metabolizador para fenitoína en 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Frecuencias alélicas del gen <i>CYP2C9*2</i> en diferentes poblaciones.	6
Figura 2	Frecuencias alélicas del gen <i>CYP2C9*3</i> en diferentes poblaciones.	7
Figura 3	Causas más frecuentes de epilepsia en México.	11
Figura 4	Tipo de crisis epiléptica y fármaco de elección. Fenitoína.	18
Figura 5	Metabolismo de Fenitoína por las enzimas <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> .	20
Figura 6	Localización de las enzimas CYPs en la célula.	24
Figura 7	Principio de acción de las sondas Taqman.	28
Figura 8	Figura 8. Curvas de los análisis multicomponentes de detección de alelos mediante sondas Taqman con fluoróforos FAM (rojo) y HEX (azul).	29
Figura 9	Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> , de pacientes con epilepsia (de 1 al 6). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	41
Figura 10	Figura 10. Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> , de pacientes con epilepsia (de 7 al 12). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	42
Figura 11	Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> , de pacientes con epilepsia (de 13 al 18). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	43
Figura 12	Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> , de pacientes con epilepsia (de 19 al 21). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Flujograma para la determinación del gen <i>CYP2C9</i> , alelos: <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> , y <i>CYP2C9*3</i> , mediante PCR en tiempo real; y fenotipo metabolizador.	59
Anexo 2	Consentimiento informado individual para comunidades nativas y meztizas.	60
Anexo 3	Ficha de datos del paciente	63
Anexo 4	Toma de muestras de sangre.	64
Anexo 5	Obtención de ADN genómico humano y cuantificación mediante espectrofotometría UV.	65
Anexo 6	Sondas Taqman y Cabina pre-PCR, preparación del “mix” para PCR-TR.	66
Anexo 7	Programación del termociclador para PCR-TR.	67
Anexo 8	Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de <i>CYP2C9*1</i> , <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> , de pacientes con epilepsia. Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.	68
Anexo 9	Matriz de consistencia	69



## Resumen

El nuevo conocimiento que se espera obtener con el estudio que planteamos, consiste en realizar análisis del ADN en pacientes con epilepsia que fueron diagnosticados en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, con el objetivo de determinar el polimorfismo del gen *CYP2C9* e identificar los alelos silvestres *CYP2C9\*1* y/o mutantes del gen *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*; y establecer el fenotipo metabolizador de fenitoína en cada paciente que ingrese al estudio. El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), durante los meses de noviembre de 2017 a marzo de 2018 en la ciudad de Ayacucho, Perú; y en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) del Departamento de Oncología Básico Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el mes de febrero de 2018.

Los resultados demuestran que los 21 pacientes que ingresaron al estudio presentan el genotipo *CYP2C9\*1*. Conclusión: Los alelos identificados en los 21 pacientes con epilepsia que ingresaron al estudio son alelos homocigoto *\*1/\*1*, silvestre o wild type. Todos presentan el fenotipo metabolizador normal para fenitoína y las frecuencias alélicas del gen *CYP2C9*, en la población estudiada es de 21 (1.0) para *CYP2C9\*1*, 0 (0.0) para *CYP2C9\*2* y 0 (0.0) para *CYP2C9\*3*.

**Palabras clave:** Farmacogenómica, *CYP2C9*, epilepsia, fenitoína.

## I. INTRODUCCIÓN

La Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la epilepsia como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis convulsivas recurrentes, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas. Uno de los tratamientos más difundidos es con el fármaco fenitoína (DFH), es un medicamento de alto riesgo, pudiendo provocar efectos adversos o fracaso terapéutico, éste fármaco es metabolizado por enzimas codificadas en los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* del ADN del paciente, pudiendo ser silvestre o mutantes, la misma que determina el fenotipo metabolizador.<sup>1</sup>

Ésta investigación es necesaria porque la epilepsia es el trastorno neurológico crónico más frecuente y afecta al menos a 50 millones de personas en todo el mundo<sup>1,2</sup> y que la población de la región Ayacucho no es ajena a éste mal. Sin embargo, uno de los problemas de su tratamiento con fenitoína, es la considerable variabilidad interindividual en la respuesta.

El nuevo conocimiento que se espera obtener con el estudio que planteamos, consiste en realizar análisis del ADN en pacientes con epilepsia diagnosticados en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, esto nos

permitirá determinar el polimorfismo del gen *CYP2C9*; es decir, si el paciente tiene gen silvestre (normal) o gen mutado (modificado).

Este conocimiento es relevante porque el gen *CYP2C9* es considerado como el principal determinante del metabolismo de fenitoína; aunque muchos factores pueden contribuir en la variabilidad de la respuesta a fármacos, la imprevisibilidad puede, al menos en parte, ser resultado de la variación genética. Estudios de farmacogenética han mostrado que los polimorfismos de enzimas metabolizadoras de fármacos, contribuyen a dicha respuesta variable.<sup>3</sup>

Este conocimiento permitirá brindar al médico tratante, datos genéticos del paciente, de manera que si se evidencia la presencia de variantes alélicas \*2 y \*3 del gen *CYP2C9*, que tienen el fenotipo metabolizador lento para fenitoína, serían los que influyen en los efectos adversos, interacciones medicamentosas o fracaso al tratamiento; entonces se requiere de un ajuste de dosis, más bajas para evitar toxicidad en los sustratos que son metabolizados por estas enzimas. Por tanto esto va permitir un mejor tratamiento de estos pacientes y a la vez una mejora en su calidad de vida.<sup>4, 5</sup>

Por su conveniencia, este trabajo de investigación permitirá obtener datos genéticos respecto a la presencia de los diferentes alelos del gen *CYP2C9*, los mismos que tienen una relación directa con el metabolismo de la fenitoína, en los pacientes con epilepsia.

Por la relevancia social, los resultados de ésta investigación deberán ser publicados en revistas especializadas, dentro del marco de la ética, así mismo deberá difundirse a nivel de los pobladores de la zona, que constituyen los beneficiarios primarios de las bondades del presente estudio, en camino a una medicina personalizada.

Las implicaciones prácticas que devienen de los resultados, principalmente se orienta al cuidado de la salud de las personas que padecen de epilepsia, al estar

informados de los diferentes efectos que causan los alelos silvestres o mutantes del gen *CYP2C9*, orientado a una medicina personalizada.

Su valor teórico, radica que a partir de los resultados se llegue a identificar los alelos silvestres o mutantes presentes en el ADN de los pacientes que ingresaron al estudio, y contribuya al conocimiento de frecuencias alélicas que estén circulando en la población ayacuchana.

La utilidad metodológica, que desarrollemos en el presente estudio, constituye un protocolo nuevo para la recolección de datos; es bastante sencillo, sensible, específico, eficiente y eficaz, para la identificación de alelos silvestres o mutantes del gen *CYP2C9*, la misma que podrá ser utilizado para estudios posteriores en poblaciones mayores y de otras enfermedades humanas en nuestra región.

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, al cual pertenece el presente trabajo, cuyo propósito va orientado a determinar el polimorfismo del gen *CYP2C9* y fenotipo metabolizador de fenitoína en pacientes con epilepsia diagnosticados en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho y brindar al médico tratante, datos genéticos del paciente con epilepsia, de manera que sea útil en el ajuste de dosis, permitir un mejor tratamiento y una mejora en la calidad de vida del paciente.

Como parte del estudio, en el presente trabajo se formuló los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

- Determinar el polimorfismo del gen *CYP2C9* y fenotipo metabolizador de fenitoína en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.

**Objetivos Específicos:**

- Identificar los alelos silvestres y/o mutantes del gen *CYP2C9* en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena”.
- Establecer el genotipo y fenotipo metabolizador de fenitoína del gen *CYP2C9* en cada paciente que ingrese al estudio.
- Determinar las frecuencias alélicas del gen *CYP2C9*, en la población estudiada.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En un estudio realizado en Korea por Soo-Youn Lee<sup>6</sup>, examinó la repercusión de las formas alélicas \*2 y \*3 de *CYP2C9* y *CYP2C19* en el metabolismo de DFH en 97 pacientes epilépticos, explicando que hay 39.6% de la varianza de los niveles séricos de DFH en los individuos con la presencia de alguno de estos polimorfismos. Haciendo evidente la necesidad de análisis farmacogenéticos en los pacientes, para el mejorar el ajuste de la dosis.

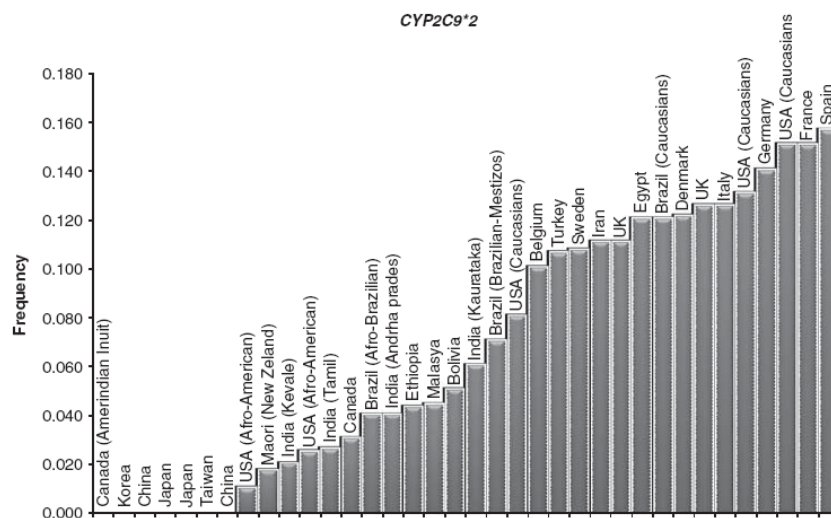
Mamiya<sup>7</sup> señaló que las concentraciones séricas de fenitoína denominada también difenilhidantoina (DFH) en pacientes japoneses, con el alelo *CYP2C9*\*3, incrementan dramáticamente las concentraciones de DFH aún con dosis bajas, y los pacientes con los alelos \*2 y \*3 deben ser tratados cuidadosamente si sus dosis son elevadas, ya que se incrementan fácilmente debido a la saturación del sistema enzimático.

En Holanda Van der Weide<sup>8</sup>, determinó el efecto de los genotipos *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3 sobre la dosis de fenitoína en relación con la concentración sérica, investigó en un grupo de 36 pacientes holandeses con diagnóstico de epilepsia que estaban recibiendo DFH a largo plazo. Los pacientes portadores de al menos un alelo mutante requirieron una dosis de mantenimiento 37% menor de fenitoína para alcanzar una concentración terapéutica, en comparación con los

pacientes homocigotos para el alelo silvestre. Una dosis de mantenimiento inferior a 200 mg/día fue suficiente para alcanzar una concentración sérica de DFH eficaz en los portadores de alelos mutantes, mientras que en los pacientes con genotipo silvestre la dosis requerida fue > 300 mg/día para alcanzar niveles terapéuticos.

Dorado<sup>9</sup>, en la figura 01, resume las frecuencias alélicas del *CYP2C9\*2* en diferentes poblaciones del mundo; España, Francia y Estados Unidos (caucásicos) reportan las mayores frecuencias con 0.16, 0.15 y 0.15 respectivamente; seguidos de Alemania (0.14), Italia, Reino Unido, Dinamarca, Brasil (caucásicos) y Egipto con 0.13, y en menor frecuencia en poblaciones de Canadá (amerindios), Corea, China, Japón y Taiwán.

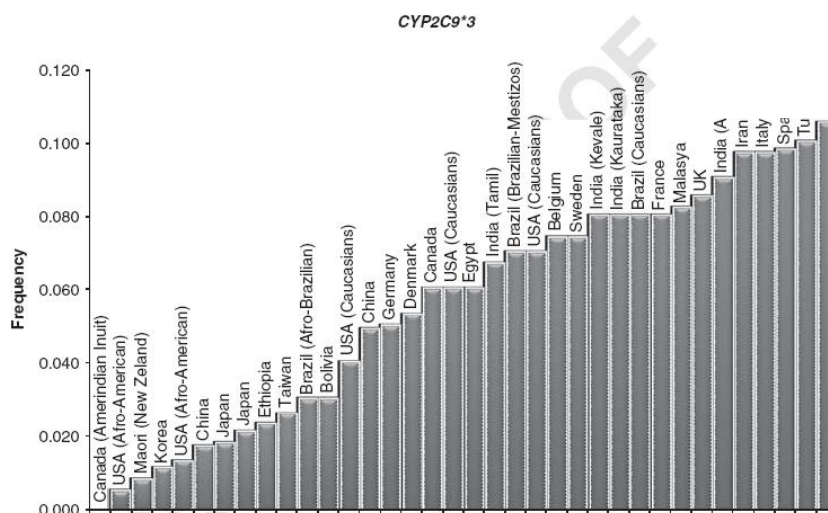
Figura 1. Frecuencias alélicas del gen *CYP2C9\*2* en diferentes poblaciones.



Tomado de Dorado P *et al*, 2010 (Referencias: Sánchez *et al*, 2009; Xie *et al*, 2002; Dorado *et al*, 2003; Dorado *et al*, 2007; Gutiérrez O, 2012)

En el caso del gen *CYP2C9\*3* (figura 02) se observó que las poblaciones con mayor frecuencia corresponden a Reino Unido, Turquía (> 0.100), España, Italia, Irán (0.100); India, Malasia, Francia, Brazil y Bélgica (< 0.1).

Figura 2. Frecuencias alélicas del gen *CYP2C9\*3* en diferentes poblaciones.



Tomado de Dorado P *et al*, 2010 (Referencias: Sánchez *et al*, 2009; Xie *et al*, 2002; Dorado *et al*, 2003; Dorado *et al*, 2007; Gutiérrez O, 2012)

Gutiérrez<sup>10</sup>, el año 2012, estudió en Durango México, una población de 50 pacientes con diagnóstico de epilepsia y bajo el tratamiento con fenitoína, de los cuales: 24 (48%) fueron mujeres en edades comprendidas de los 18 a 78 años y 26 (52%) varones en edades comprendidas de los 22 a 64 años. Determinó que la frecuencia del alelo *CYP2C9\*2* fue de 0.12, detectado en 12 pacientes con genotipo heterocigoto (\*1/\*2); mientras que, la frecuencia del alelo *CYP2C9\*3* fue de 0.04, encontrado en 4 pacientes con genotipos heterocigotos (\*1/\*3).

Moyano<sup>11</sup> en su trabajo de tesis Epidemiología de la epilepsia en el Perú: Neurocisticercosis(NCC) como causa de epilepsia secundaria en la región norte del Perú, desarrolló estudios basados en la comunidad, y una revisión sistemática cuyos objetivos fueron: a) evaluar la prevalencia de Neurocisticercosis(NCC) asintomática, b) la prevalencia de epilepsia asociada a cisticercosis, c) determinación de la exposición a cisticercosis y d) desarrollar una intervención comunitaria que interrumpa la transmisión de cisticercosis. De



256 pacientes asintomáticos que tuvieron una tomografía axial computarizada (TAC) cerebral sin contraste, 48 (18%) tuvo una NCC calcificada. La prevalencia de epilepsia encontrada fue de 17.25/1000 habitantes y la proporción de NCC en personas con epilepsia fue de 39% (109/282). La prueba de Western Blot (EITB-LLGP) para cisticercosis fue positivo en el 40% de los individuos con epilepsia y en el 36.9% de la población general. La asociación entre cisticercosis y epilepsia tuvo un OR de 2.7 (95% CI 2.1-3.6,  $p < 0.001$ ). El tratamiento masivo con niclosamida en humanos ( $n=3$ ), y población porcina más vacunación fue implementada en 107 comunidades rurales de Tumbes; en 105 de 107 no hubo nuevos cerdos infectados con cisticercosis. Concluyó que la NCC es un factor contribuidor de epilepsia y que se puede cortar la transmisión de *Taenia solium* a escala regional.

## **2.2. Epilepsia.**

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más antiguas de la humanidad. Las primeras descripciones sobre ella han sido encontradas en textos egipcios donde la denominaban “nesejet” (enfermedad enviada por dios) y en la antigua Grecia donde esta enfermedad fue considerada “el mal sagrado” por estar presente solo en las familias reales o de la aristocracia, por las uniones o matrimonios incestuosos.<sup>12</sup>

Según la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia se define como una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis convulsivas recurrentes, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas.<sup>13</sup>

Por tanto, la epilepsia es una enfermedad cerebral crónica que afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por convulsiones recurrentes. Estas convulsiones son episodios breves de movimientos involuntarios que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad

(convulsiones generalizadas) y a veces se acompañan de pérdida de la consciencia y del control de los esfínteres.<sup>13</sup>

Las crisis epilépticas son síntomas de disfunción cerebral que se producen por una descarga hipersincrónica o paroxística de un grupo de neuronas hiperexcitables localizada en el córtex cerebral.<sup>14</sup>

La epilepsia fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad crónica desatendida con elevada prevalencia en países de pobres recursos. Cinco millones de personas con epilepsia se encuentran en Latinoamérica y el Caribe. Ante la falta de una estimación real de la carga de enfermedad de la Epilepsia, la OMS en el año 1997 inició la campaña “saliendo de las sombras”, cuyos objetivos generales fueron: a) incrementar el conocimiento sobre epilepsia y b) generar información epidemiológica básica para dar soporte a los departamentos de salud una vez identificadas las necesidades. Una de las conclusiones finales de esta estrategia fue que el 10% de la carga de los desórdenes mentales en el mundo era causado por la epilepsia, calculado en AVAD (años de vida ajustados por discapacidad).<sup>13</sup>

Esta información hizo que el Programa para superar las brechas en salud mental en el año 2008 declarara a la epilepsia como una de las ocho enfermedades de atención prioritaria.<sup>13</sup>

A pesar del descubrimiento de nuevas drogas anticonvulsivantes, avances en la comunicación y avances tecnológicos en el diagnóstico de epilepsia en los últimos 20 años, estas herramientas no siempre están disponibles para los pobladores de las comunidades rurales que habitan los países de bajos y medianos ingresos económicos. En éstos, la falta de médicos especialistas y la falta de disponibilidad de tratamiento antiepiléptico hace que estos cuadros crónicos empeoren considerablemente, llevando a las personas a limitar sus capacidades, teniendo como única opción la evaluación por curanderos

tradicionales (conocidos como “Chamanes y/o curiosos”) para su atención en salud como en épocas pre-incaicas.<sup>15, 16, 17, 18</sup>

### **2.2.1. Etiología de la epilepsia.**

La epilepsia es una condición neurológica crónica definida como “la presencia de dos o más crisis convulsivas no provocadas con un tiempo entre crisis mayor a las 24 horas. La OMS refiere que habrían en el mundo cerca de 50 millones de personas con epilepsias<sup>13</sup> Esta enfermedad neurológica puede ser tratada y controlada, pero en países en vías de desarrollo donde la falta de neurólogos, imágenes de ayuda diagnóstica y medicina anticonvulsivante es un problema existente, tener epilepsia puede ser una causa de discapacidad.<sup>13, 19</sup>

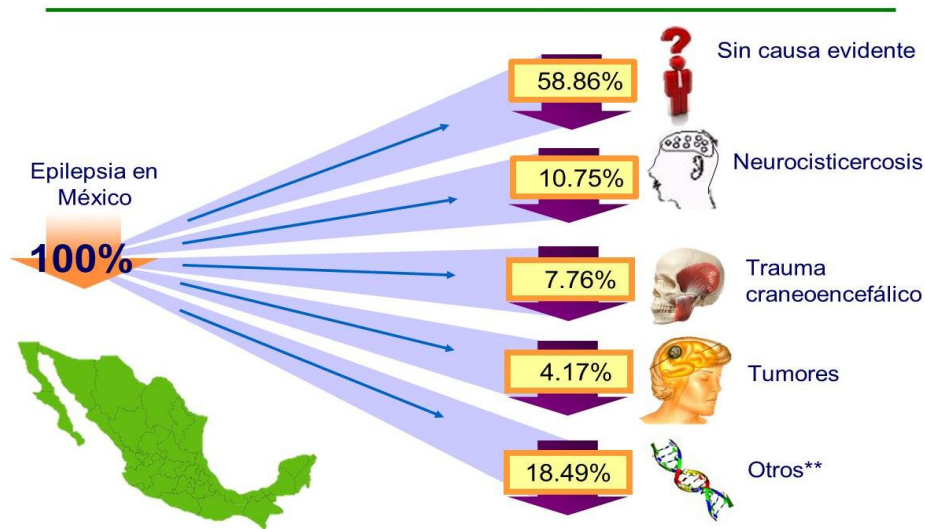
La etiología de las crisis epilépticas es multifactorial en ella participan factores genéticos y adquiridos. Si bien hay factores genéticos que están involucrados en la patología, su recurrencia varía del 5% al 10% en familiares directos. Hay tres factores genéticos potenciales que contribuyen a la aparición de las crisis epilépticas: 1) Susceptibilidad interindividual a presentar crisis en respuesta a una alteración cerebral crónica o transitoria, 2) Algunas condiciones que producen la enfermedad epiléptica son genéticamente transmitidas (esclerosis tuberosa, fenilcetonuria...), 3) Las epilepsias primarias debidas a una disfunción genética de la excitabilidad cerebral y de su sincronización.<sup>20</sup>

Desde el punto de vista fisiopatológico las convulsiones se definen como una alteración repentina de la función del Sistema Nervioso Central (SNC), a causa de una descarga eléctrica paroxística de alto voltaje de frecuencia elevada o de frecuencia baja sincrónica, causadas por un defecto en el balance entre los mecanismos excitatorios e inhibitorios en el cerebro. Al parecer, la predisposición genética o un antecedente de hipoxia perinatal producen una lesión hipocampal que favorece la aparición de crisis febriles en la infancia como marcador temprano de esclerosis mesial en el adulto. Sin embargo, se han encontrado

pruebas que sugieren la presencia de una malformación del desarrollo hipocampal (persistencia de células de Cajal-Retzius, aumento en la neurogénesis y organización anormal en la arquitectura de la capa de células del giro dentado) que, en asociación a una lesión subsecuente (traumatismos, infección).<sup>21, 22, 23</sup>

Estudios realizados por Salazar-Zuñiga<sup>24</sup>, las causas más frecuentes de Epilepsia en México son: sin causa evidente (58.83%), neurocisticercosis (10.75%), trauma craneoencefálico (7.76%) y tumores (4.17%).

Figura 3. Causas más frecuentes de epilepsia en México.



### 2.2.2. Clasificación de las epilepsias.

La Clasificación Internacional de las Crisis Epilépticas (Comisión para la Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia ILAE-1989; Berg divide las manifestaciones clínicas en crisis parciales (comienzan en un área hemisférica específica) y en crisis generalizadas (comienzan en los dos hemisferios simultáneamente).<sup>25</sup>

Cuando una crisis parcial no produce alteración de la conciencia se denomina crisis parcial simple. Si la conciencia está alterada se denomina crisis parcial compleja. Los síntomas o signos de las crisis parciales simples dependerán del

área cortical involucrada en el foco epiléptico y se dividen en: motoras, sensitivas, autonómicas y psíquicas. Las crisis parciales simples sin síntomas motores son denominadas auras.<sup>25</sup>

Las descargas neuronales anormales focales pueden propagarse después de un tiempo desde su inicio y dar lugar a que la crisis parcial evolucione a una crisis parcial compleja o a una crisis generalizada, denominándose entonces crisis parcial secundariamente generalizada.<sup>25</sup>

Las crisis generalizadas pueden ser convulsivas y no convulsivas. Las convulsivas incluyen las tónicas, clónicas y tónico- clónicas.<sup>25</sup>

### **2.2.3. Epidemiología de la epilepsia.**

En el mundo, la OMS refiere que más de 50 millones de personas en el mundo tienen epilepsia, mientras que otros grupos de investigación definen esta cifra en 75 millones, de los cuales el 80% se encuentra en los países en vías de desarrollo.<sup>13</sup> A pesar que el 70-80% de las personas con epilepsia pueden controlar sus crisis convulsivas, uno de los grandes desafíos hoy en día es lograr disminuir la brecha de tratamiento.<sup>26</sup> Actualmente hay poca disponibilidad de medicamentos anticonvulsivantes de primera línea (básicos) en el primer nivel de atención (carbamazepina, fenitoina, fenobarbital y ácido valproico) que permitan un control de las crisis convulsivas. El diagnóstico de epilepsia no se realiza en el primer nivel de atención, sino en los Hospitales Regionales o de Referencia, haciendo tardía la atención de este tipo de pacientes y muchas veces nula cuando el paciente tiene poca disponibilidad económica para movilizarse a estos Establecimientos de Salud con especialistas. Adicionalmente, el alto costo de los exámenes de ayuda diagnóstica por imágenes como la tomografía axial computarizada cerebral y la resonancia magnética nuclear, impiden un buen control y una adecuada clasificación de las epilepsias siguiendo los lineamientos de ILAE (Liga Internacional de Lucha contra la Epilepsia).<sup>26</sup> Estudios realizados

desde el año 1975 en Latinoamérica demuestran que la prevalencia de vida de epilepsia fluctúa en los rangos de 6 a 44.3 por 1000 habitantes y la prevalencia de epilepsia activa en rangos de 5.7 a 57 por cada 1000 habitantes.<sup>13</sup> Nuestra población tiene factores extrínsecos prevenibles que ocasionan epilepsia sintomática teniendo como ejemplo en el rubro de las enfermedades infecciosas: cisticercosis, hidatidosis, herpes virus, dengue, encefalitis, etc.

En Latinoamérica y el Caribe (LAC), la primera revisión sistemática sobre epilepsia fue desarrollada por Burneo y colaboradores en el año 2005,<sup>12</sup> haciendo una evaluación de 1773 artículos publicados desde 1966. La mediana de prevalencia de vida de epilepsia fue de 17.8/1000 con rangos entre 6-44.3/1000 (N=28) y la mediana de la prevalencia de epilepsia activa fue de 12.4 con rangos entre 5.1-3157/1000 (n=11). Estos datos fueron obtenidos de estudios que cumplieron los requisitos estandarizados para estudios epidemiológicos poblacionales (cuestionarios validados, aplicación de encuestas puerta-a-puerta y evaluación médico neurológica<sup>12</sup>. Los exámenes de ayuda diagnóstica como tomografía axial computarizada o resonancia magnética nuclear a pesar de su gran disponibilidad en países desarrollados, en regiones rurales de Latinoamérica esta disponibilidad es escasa o nula (una gran proporción de tomógrafos se encuentran en grandes ciudades para asegurar su rentabilidad); 7/28 (25%) de los estudios informaron datos imagenológicos. No se encontró diferencia significativa entre la prevalencia de epilepsia en comunidades rurales 16.3/1000 y poblaciones urbanas 19.9/1000, la metodología desarrollada y definiciones fueron las propuestas por la OMS e ILAE, solo un par de estudio usaron definiciones propias o de otros autores.<sup>13</sup>

Así mismo, estimaron que de los 75 millones de personas que viven en América Latina, entre 11- 29 millones estarían infectados con cisticercosis y 14.9 millones podrían tener NCC. De éstos entre 450,000 a 1.5 millones de personas tendrían

epilepsia y NCC demostrando que la NCC es un gran problema de salud pública.<sup>13</sup>

En Perú, la NCC es la causa de una gran proporción de epilepsia sintomática o secundaria en un departamento fronterizo del norte del Perú, cifras similares o quizá más elevadas podríamos encontrar en otras regiones aledañas (Piura, Lambayeque- La Libertad). La prevalencia de NCC asintomática demostrada en esta tesis es considerablemente elevada, lo que explica una incrementada y constante exposición al Binomio Teniasis Cisticercosis, investigaciones a mediano y largo plazo para monitorizar a pacientes asintomáticos proporcionará información aún no respondida en los estudios expuestos sobre la epileptogénesis de los pacientes con NCC.<sup>11</sup>

En Ayacucho, según el Informe de la Oficina General de Estadística del Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, señala que el año 2016 hubo 844 casos y el 2017 registró 1,069 casos de epilepsia en sus diferentes formas, como se detalla en las tablas 1 y 2.<sup>27</sup>

Tabla 1. Morbilidad general de epilepsia, en consulta externa, por subcategoría según Clasificación Internacional de Enfermedades<sup>13</sup> (CIE 10). Año 2016. Oficina General de Estadística del Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho.

N°	Morbilidades	Masculino	Femenino	Total
1	G409-Epilepsia, tipo no especificado	220	225	445
2	G402-Epilepsia y síndromes epilépticos sintomáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	147	152	299
3	G401-Epilepsia y síndromes epilépticos sintomáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	16	16	32
4	G403-Epilepsia y síndromes epilépticos idiopáticos generalizados	15	15	30
5	G400-Epilepsia y síndromes epilépticos idiopáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	12	10	22
6	G408-Otras epilepsias	7	3	10
7	F803-Afasia adquirida con epilepsia(LANDAU – KLEFNER)	1	3	4
8	G404-Otras epilepsias y síndromes epilépticos generalizados	2		2
	<b>TOTAL</b>	<b>420</b>	<b>424</b>	<b>844</b>

Tabla 2. Morbilidad general de epilepsia, en consulta externa, por subcategoría según Clasificación Internacional de Enfermedades<sup>13</sup> (CIE 10). Año 2017. Oficina General de Estadística del Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho.

Nº	Morbilidades	Masculino	Femenino	Total
1	G409-Epilepsia, tipo no especificado	298	256	554
2	G402-Epilepsia y Síndromes epilépticos sintomáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	229	227	456
3	G408-Otras epilepsias	13	11	24
4	G400-Epilepsia y síndromes epilépticos idiopáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	10	7	17
5	G403-Epilepsia y síndromes epilépticos idiopáticos generalizados	4	7	11
6	G404-Otras epilepsias y síndromes epilépticos generalizados	2	1	3
7	G401-Epilepsia y síndromes epilépticos sintomáticos relacionados con localizaciones (FOCALES)	2		2
8	F803-Afasia adquirida con epilepsia (LANDAU-KLEFFNER)	2		2
	<b>TOTAL</b>	<b>560</b>	<b>509</b>	<b>1069</b>

#### 2.2.4. Fisiopatología de la epilepsia.

Desde el punto de vista fisiopatológico las convulsiones se definen como una alteración repentina de la función del Sistema Nervioso Central (SNC), a causa de una descarga eléctrica paroxística de alto voltaje de frecuencia elevada o de frecuencia baja sincrónica, causadas por un defecto en el balance entre los mecanismos excitatorios e inhibitorios en el cerebro.<sup>22</sup>

Para que las descargas eléctricas se generen y se propaguen, es necesario que existan dos mecanismos esenciales para la provocación de la crisis: a) Excitabilidad neuronal aumentada, b) Sincronización de una determinada población neuronal.<sup>22</sup>

De los dos mecanismos citados, la excitabilidad neuronal parece revestir más importancia. La función neuronal normal comporta el mantenimiento de una diferencia de potencial transmembrana de 60-80 mV, con negatividad intracelular, gracias a las concentraciones relativas de diferentes iones en los



espacios intra y extracelular. Los flujos que recibe una determinada neurona pueden provocar una despolarización de la membrana neuronal que provoca un cambio en su permeabilidad con una apertura selectiva de los canales iónicos. Cuando se alcanza un determinado umbral de despolarización, se produce un potencial de acción normal. Cuando por diferentes causas se altera el equilibrio entre los responsables principales de la excitación y de la inhibición del encéfalo representados por el potencial post-sináptico excitatorio y el potencial sináptico inhibitorio, se provoca una despolarización paroxística.<sup>22</sup>

Si esta alteración implica solo un pequeño grupo de neuronas y no difunde en otras áreas cerebrales, el disparo de las neuronas origina una serie de descargas periódicas en espigas, con incremento progresivo de su amplitud y de su frecuencia evidenciables en el trazado electroencefalográfico. Si el número de neuronas que descargan espontáneamente es mayor y supera a la influencia inhibitoria de las neuronas circundantes (focus epiléptico), se producirá una crisis y una disritmia focal que se reflejara en el electroencefalograma (EEG). Si la actividad eléctrica difunde desde el foco epiléptico a otras áreas cerebrales, se producirán las primeras manifestaciones clínicas de la crisis convulsiva con las características descargas de poliespigas de alto voltaje en el EEG. Entre las numerosas causas de excitabilidad neuronal aumentada, una de particular interés viene representada por cambios en las concentraciones de neurotransmisores excitatorios y/o inhibitorios. Las neuronas normalmente se comunican entre ellas mediante "sinapsis", y esta es mediada por neurotransmisores excitatorios como el glutamato, la acetilcolina y la serotonina; y neurotransmisores inhibitorios como el Acido Gamma Amino Butírico (GABA) o glicina. Estos neurotransmisores liberados en la hendidura sináptica, se unen a receptores específicos en la membrana postsináptica influyendo en la permeabilidad de determinados iones, comportando cambios en la polaridad.<sup>22</sup>

### **2.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia.**

Las drogas más utilizadas para el control de las crisis convulsivas son:

**Fenobarbital:** Es utilizado en niños, con crisis generalizadas y convulsiones febriles, sólo se vende con fórmula médica, es una de las drogas más antiguas para el tratamiento de la Epilepsia. Es una droga eficaz, segura y barata pero puede producir efectos secundarios indeseables como trastornos del aprendizaje e hiperactividad (inquietud excesiva que hace necesario suspender el tratamiento con dicha droga).<sup>28</sup>

**Difenil hidantoína sódica:** Se vende en el país como Fenitoina, Epamin o Hidanil. Está indicada en las crisis generalizadas o crisis parciales. Es barata y eficaz pero produce trastornos secundarios consiste en crecimiento de las encías, acné, crecimiento de los vellos cutáneos, y deformaciones en la cara por lo cual las mujeres no deben usar esta droga salvo en casos especiales.<sup>28</sup>

**Carbamazepina:** Se vende como Carbamazepina 200 mgrs, Tegretol o Carbazol de gran utilidad en las crisis generalizadas y crisis parciales. Es eficaz y desencadena pocos efectos secundarios.<sup>28</sup>

**Ácido valproico:** (Depakene – Valcote – Leptilan): son eficaces en crisis generalizadas, crisis parciales y en ausencias; es una droga cara y produce efectos secundarios consistentes en somnolencia, trastornos gástricos y hepáticos, caída del pelo, obesidad y atraso menstrual.<sup>28</sup>

Existen otras drogas anticonvulsivantes de uso especial que no es del caso mencionar. Todo paciente debe conocer los efectos no deseados de las drogas prescritas por su médico tratante. Llama la atención sobre las alergias de la piel que producen ocasionalmente varios de estos medicamentos. Un brote cutáneo semejante al sarampión y que si no se retira el medicamento inmediatamente se puede producir una complicación dermatológica delicada. Lo indicado en este caso es suspender la droga e ir al médico tratante inmediatamente.<sup>28</sup>

La elección del fármaco antiepiléptico que se debe utilizar en terapia depende del tipo de crisis y/o síndrome, de factores dependientes del paciente (edad, sexo y patología asociada), experiencia del médico con un determinado compuesto y fundamentalmente de la efectividad (suma de tolerabilidad y eficacia) del fármaco antiepiléptico de elección. La forma más común de seleccionar el fármaco es mediante el tipo de crisis que tenga el paciente (Figura 4).<sup>28</sup>

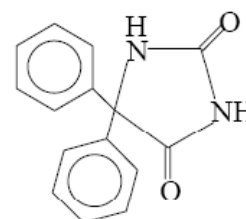
Figura 4. Tipo de crisis epiléptica y fármaco de elección.

TIPO DE CRISIS	FARMACO
Parciales simples y complejas	Carbamazepina, Fenitoína, Primidona, Fenobarbital Gabapentina, Lamotrigina, Vigabatrina, Felbamato
Secundariamente generalizadas	Carbamazepina, Fenitoína, Primidona, Fenobarbital, Valproato(?), Gabapentina, Lamotrigina, Vigabatrina, Felbamato
Generalizadas	
Tónico-clónicas	Fenitoína, Carbamazepina, Valproato, Fenobarbital
Ausencias	Etosuximida, Valproato
Mioclónicas	Valproato, Clonazepam
Atónicas	Valproato, Clonazepam, Etosuximida

Scheuer ML et al. Lancet 1990; 323: 1468-1474  
Dichter MA, Brodie MJ. N Eng J Med 1996; 334: 1583-1590

### 2.3.1. Difenilhidantoina o Fenitoína.

Dentro de los medicamentos usados para el tratamiento de la epilepsia se encuentra la fenitoína también denominada Difenilhidantoina (DFH) (Figura 4-A). Es un fármaco eficaz frente a convulsiones tónico-clónicas generalizadas y frente a crisis parciales. Es un agente



Fenitoína

anticonvulsivo que inhibe la propagación de la crisis, posiblemente por promover la salida de sodio de las neuronas<sup>4</sup>. La fenitoína tiende a estabilizar el umbral contra la hiperexcitabilidad provocada por la estimulación repetida o provocada por cambios en el medio, que alteran el gradiente de sodio de la membrana. La molécula de fenitoína es un ácido débil con limitada hidrosolubilidad, aún en el

intestino, además este fármaco exhibe una farmacocinética no-lineal con cinética de eliminación de orden cero, con grandes diferencias interindividuales. Su índice terapéutico es estrecho (Tabla 3) y tiene un riesgo alto de fracaso terapéutico o de la presencia de eventos adversos serios en personas susceptibles.<sup>28</sup>

Tabla 3. Farmacocinética y datos generales de Fenitoína (DFH).

Biodisponibilidad (F):	90-100% 70-100%
Biodisponibilidad según presentación farmacéutica:	70-100% - Fenitoína Na <sup>+</sup> (caps, IV) 100% – Fenitoína Acido (tabs, susp)
Unión a proteínas:	90% (87-93) (Mayormente Unión a albumina)
Volumen de Distribución (Vd):	0.7L/Kg - Adultos 1.0L/Kg – Niños
Concentración máxima o pico máximo (Cmax)	2-8 horas
Tiempo de vida media (t <sub>1/2</sub> ):	La concentración en plasma y suero varia, el promedio es de 22 horas (Intervalo 8 - 60 horas)
Metabolismo	CYP2C9, CYP2C19
Eliminación:	Cinética de orden cero 1-5% se excreta en orina
Concentración terapéutica en plasma y suero.	10-20 µg/mL
Tiempo en llegar al estado estable (steady state)	1-4 semanas dosis 300 mg/día (más tiempo con dosis mayores)
Indicaciones Terapéuticas	Epilepsia gran mal, epilepsia focal, motora o sensorial, epilepsia psicomotora o del lóbulo temporal.
Reacciones adversas	Puede presentarse hiperplasia gingival con la terapia a largo plazo, reacciones alérgicas cutáneas, nistagmo, diplopia, ataxia, vértigo, disartria, confusión mental, mareo, insomnio, nerviosismo, calambres y cefalea; así como náuseas, gastralgia, anorexia, vómito y estreñimiento, también se han reportado erupciones, dermatitis eritematosa e hirsutismo.

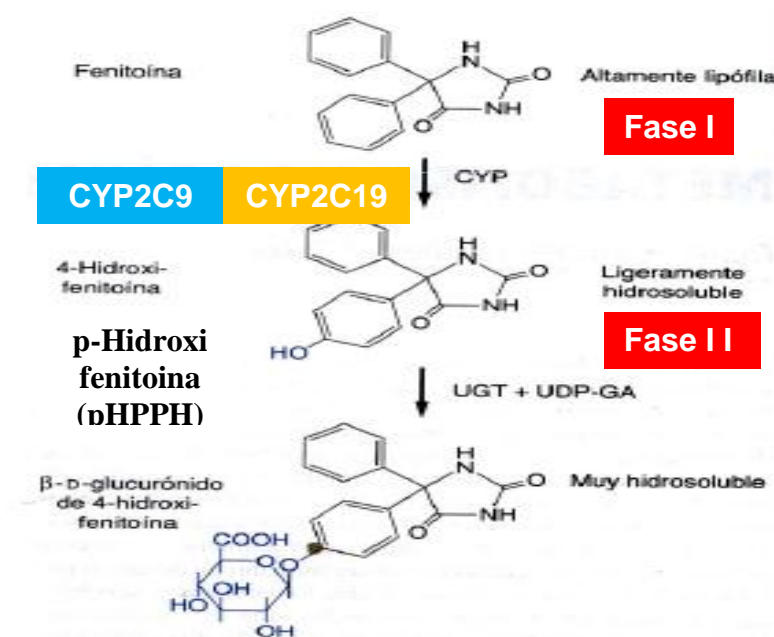
Tomado de: Finkel *et al.*, 2009; Kerb *et al.*, 2001; Mamiya *et al.*, 1998.

### 2.3.2. Metabolismo de la Fenitoína.

La fenitoína se biotransforma en el hígado por medio del metabolismo oxidativo. La vía principal consiste en la formación de *p*-hidroxifenitoína (PHHPH), que corresponde al 80% de todos los metabolitos. La enzima *CYP2C9* se encarga

del 90% de la depuración (clearance intrínseco neto) de fenitoína, mientras que la enzima *CYP2C19* tiene una participación menor en este proceso (10%)<sup>3</sup>. Esta contribución relativa de la enzima *CYP2C19* en el metabolismo de la fenitoína puede, sin embargo, aumentar en presencia de concentraciones más altas de fenitoína. Debido a que el sistema de citocromo P450 hepático involucrado en la hidroxilación de la fenitoína se satura con altas concentraciones séricas de fenitoína, pequeños incrementos en las dosis de fenitoína pueden aumentar su vida media y producir importantes aumentos en los niveles séricos, cuando éstos se hallan en el límite terapéutico o por encima del mismo.<sup>28</sup>

Figura 5. Metabolismo de Fenitoína por las enzimas *CYP2C9* y *CYP2C19*.



Fuente: Caraco *et al.*, 2001.<sup>2</sup>

Por lo general, los pacientes que tienen niveles séricos inusualmente bajos son los que no cumplen con el tratamiento.<sup>26</sup> Los niveles infrecuentemente altos son consecuencia de hepatopatías, deficiencia enzimática congénita o interacciones medicamentosas que dan como resultado una interferencia metabólica. Los pacientes que presentan amplias variaciones en los niveles séricos de fenitoína,

a pesar de las dosis estándar, representan un problema clínico arduo.<sup>26</sup> En dichos pacientes, las determinaciones del nivel sérico de fenitoína pueden ser de gran utilidad. Los niveles en el pico máximo, obtenidos en el momento en que se espera la concentración máxima (2-8 horas), indican el umbral de cada persona para la aparición de efectos colaterales relacionados con la dosificación.<sup>26</sup>

### **2.3.3. Factores que intervienen en la respuesta al tratamiento farmacológico.**

Es común que los pacientes respondan de manera diferente al mismo tratamiento. Esto explica que ningún fármaco es 100% eficaz para todos los individuos. Respecto de los antiepilépticos, ningún agente es efectivo en más del 60% de los pacientes y todos ocasionan efectos adversos considerables en un porcentaje variable de sujetos. La variabilidad en la respuesta a un medicamento, puede ser atribuida a factores farmacodinámicos o farmacocinéticos. Las diferencias interindividuales en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, pueden dar lugar a variabilidad en las concentraciones séricas del fármaco y sus metabolitos.<sup>29</sup>

Es por ello que se ha intentado optimizar el tratamiento mediante la individualización de la dosis y la evaluación de los niveles séricos del fármaco que permita reconocer y controlar la variabilidad farmacocinética. Entre los procesos farmacocinéticos, es el metabolismo uno de los principales determinantes en la eliminación y por ende en las concentraciones séricas del fármaco.<sup>29</sup>

### **2.4 Polimorfismo del gen.**

Es una variación en la secuencia del ADN que se encuentra en más del 1% de los individuos de una población. Los polimorfismos comprenden las sustituciones de una sola base, donde un solo nucleótido (A, C, G o T) es reemplazado por otro (single nucleotide polymorphisms: SNPs), deleciones o inserciones de bases

(deletioninsertionpolymorphisms: DIPs) y variaciones repetidas como microsatélites (short tandemrepeats: STRs). Los SNPs dan cuenta de alrededor de 90% de la variación y se encuentran dispersos por todo el genoma humano.<sup>17</sup>

La búsqueda del impacto de las variaciones del genoma humano en la respuesta a los fármacos se expandió en los últimos años gracias a la culminación exitosa del Proyecto Genoma Humano y, más recientemente, del Proyecto HapMap Internacional, el cual define patrones de asociación entre diferentes variantes génicas y permite seleccionar un mínimo de SNPs que capturen la máxima diversidad del genoma humano; el uso de tales SNPs evita tener que genotipificar todos los alelos<sup>13</sup>. Por supuesto, no se puede ignorar el acompañamiento de las poderosas herramientas de la bioinformática, la biotecnología y las técnicas experimentales disponibles; con cuya ayuda se ha hecho cada vez más accesible la información contenida en el genoma humano<sup>5</sup>

Hay múltiples mecanismos por los cuales un polimorfismo resulta en un fenotipo alterado de respuesta a un fármaco:

1. Cambia la secuencia de aminoácidos de la proteína, lo que da como resultado disminución, pérdida o incremento de su función (por ejemplo, se modifica la afinidad de un receptor o la actividad de una enzima por el fármaco).
2. Se altera la región del promotor de un gen, modificando su transcripción y la consiguiente cantidad de proteína expresada.
3. 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 ultra-rápido de los fármacos sustratos de la enzima.<sup>15</sup>Un biomarcador genómico se define como «una característica del ADN o del ARN indicadora de procesos biológicos normales, patogénicos o de respuesta a una intervención». De la interface entre genética y farmacología se ha originado esta nueva disciplina llamada farmacogenómica, la cual ha sido

definida por el Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER) de la FDA como «la investigación de las variaciones del ADN y del ARN relacionadas con respuesta a fármacos»; una subcategoría de ella es la farmacogenética, definida como «la influencia de las variaciones del ADN en la respuesta a fármacos». <sup>17</sup>

## **2.5 Citocromo P450.**

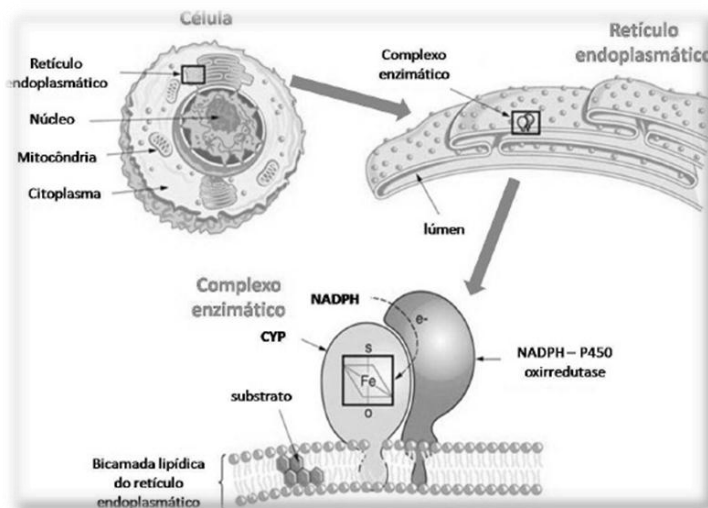
El Citocromo P450 (CYP) pertenece a un grupo de enzimas conocidas como monooxigenasas, las cuales incorporan un átomo de oxígeno en sus substratos orgánicos. <sup>30</sup> Las enzimas P450 poseen propiedades espectrales singulares: reducidas o ligadas a monóxido de carbono tienen un color rosado (de ahí la “P” de pink - rosa), con absorción a una longitud de onda de 450 nm. <sup>30</sup>

La superfamilia CYP es responsable del metabolismo de sustancias endógenas y xenobióticos, incluyendo más del 60% de todos los fármacos generalmente utilizados. La nomenclatura de las isoenzimas del CYP450 se basa en la similitud de su secuencia de aminoácidos. Aquellas proteínas que presentan 40% o más de identidad en su secuencia, son incluidas en la misma familia, identificadas por un número arábigo (ejemplo: CYP2), y las isoformas con más de 55% de identidad son incluidas en la misma subfamilia, las cuales son designadas por una letra (ejemplo: CYP2D), la enzima individual es caracterizada por un número arábigo como *CYP2D6*. Los alelos de un gen en particular se designan con un asterisco seguido de un número arábigo (*CYP2D6* \*1, *CYP2D6* \*2), el alelo \*1 es conocido como tipo salvaje o silvestre. Los alelos de las isoenzimas CYP son descritos en un sitio internacional de libre acceso. Existen por lo menos 57 genes CYP en humanos, y aproximadamente el mismo número de pseudogenes, que están agrupados en 18 familias y 44 subfamilias. <sup>30</sup>

El CYP450 se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es



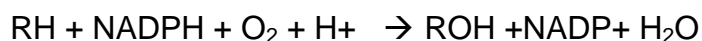
particularmente activo en el hígado en la bicapa lipídica del retículo endoplásmico de las células (Figura 7). El lumen del retículo endoplásmico es físicamente diferente de otros componentes del citosol y se adapta perfectamente a la función metabólica de estas enzimas.<sup>30</sup>



Fuente: Neve, Ingelman-Sundberg., 2008.<sup>31</sup>

Figura 6. Localización de las enzimas CYPs en la célula: Las CYPs se ensamblan en la bicapa lipídica del retículo endoplásmico (RE), la enzima NADPH-Citocromo P450 Oxidorreductasa transfiere electrones a los CYP que oxidan sus substratos en presencia de O<sub>2</sub>,

El mecanismo de oxidación de las sustancias por el citocromo P450 involucra un ciclo complejo, pero el efecto final da reacciones simples. En general las reacciones catalizadas por las enzimas del citocromo P450 presentan la siguiente estequiometría:



Esta reacción exige la presencia de un substrato ("RH"), la enzima CYP450, oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), la flavoproteína NADPH-450 reductasa y su cofactor NADPH. El metabolismo de un substrato por la enzima CYP, consume una molécula de O<sub>2</sub> y produce un substrato oxidado y una molécula de agua.<sup>31</sup>

Numerosas isoenzimas del CYP presentan gran variabilidad interindividual en su actividad catalítica debido principalmente a la influencia de polimorfismos genéticos (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *2C9*, *2C19*, *2D6*, *2E1*, *3A4* y *3A5*). El término polimorfismo se define como la existencia de múltiples alelos de un gen presentes en una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos, que aparecen en una frecuencia significativa de al menos 1% de la población.<sup>31</sup>

Como ya se ha descrito, las enzimas involucradas en el metabolismo de fenitoína son *CYP2C9* y *CYP2C19*, las cuales presentan polimorfismos genéticos, que se describen a continuación.<sup>31</sup>

#### **2.5.1. Enzima CYP2C9.**

**CYP2C9:** (Citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9) se expresa mayormente en hígado, en niveles que son los más elevados entre las enzimas *CYP2C*, ya que representan cerca de 20% de todos los CYP hepáticos.<sup>31</sup>

Los sustratos de CYP2C9 son ácidos débiles con un hidrógeno aceptor. Esta enzima está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 10% de todos los medicamentos, empleados en la clínica. Sus sustratos incluyen: los hipoglucemiantes orales, antiinflamatorios no esteroideos, diuréticos, anticonvulsivos (**fenitoína**), inhibidores de Angiotensina II, antidepresivos y anticoagulantes orales. Además esta enzima está involucrada en el metabolismo de sustratos endógenos como ácido araquidónico y linolénico.<sup>31</sup>

La enzima CYP2C9 es una proteína de 490 aminoácidos codificada por el gen *CYP2C9* que posee 8 exones y está localizado en el cromosoma 10 (10q24.1-24.3). Este gen posee 50 346 pares de bases. Se han descrito actualmente 34 variaciones alélicas en *CYP2C9*. Los alelos *CYP2C9\*2* y *\*3* son los más frecuentes y se ha referido que son relevantes en la práctica clínica.<sup>32</sup>

El alelo *CYP2C9\*2* representa un SNP (Single nucleotide polymorphism) en el exón 3 posición 430 C>T que causa un cambio de aminoácido (Arg144Cys) provocando una disminución de aproximadamente 50-70% de la actividad enzimática.

La variante alélica *CYP2C9\*3* representa un SNP en el exón 7 posición 1075 A>C, que también conduce a un cambio de aminoácido (Ile359Leu) y causa una reducción de hasta 20-30% de la actividad enzimática.<sup>32</sup>

***CYP2C9\*2***: La variable alélica *CYP2C9\*2* se debe a una transición de citocina por timina en el nucleótido 430; lo que codifica la sustitución de arginina por cisteína en el residuo de aminoácido 144. La sustitución de aminoácidos no se encuentra localizada en ninguno de los 6 sitios SRS (sitio de reconocimiento de sustrato) conocidos del centro activo de la proteína, por lo que no está asociado con la disminución en la capacidad de unión de los sustratos cumarínicos como el alelo *CYP2C9\*3*. Si en cambio, la variante *CYP2C9\*2* juega un rol en la interacción de *CYP2C9* con la enzima CYP-reductasa para oxidar el fármaco sustrato, por lo que la tasa máximo de metabolismo (V Max) es reducido al 40% frente al alelo ancestral. La frecuencia de *CYP2C9\*2* es mucho mayor en población Europea y del 0% en poblaciones Asiáticas.<sup>32</sup>

*CYP2C9\*3*: La variable alélica *CYP2C9\*3* se produce por la transversión de adenina por citocina en el nucleótido 1075, esto se traduce en la sustitución de isoleucina por leucina en el amino ácido 359. Esta variación está localizada en proximidad al centro activo de la enzima (así como las variaciones \*4 y \*5) conocido como 5SRS (sitio 5 de reconocimiento de sustrato), lo cual causa una disminución en la capacidad de unión al sustrato cumarínico, así como disminución de acceso al centro catalítico. Esto ocasiona que la capacidad metabólica de *CYP2C9\*3* sea de 3-11%, con respecto al alelo \*1. Principalmente

portadores del genotipo \*3/\*3, tienen riesgo más elevado de experimentar una severa hemorragia durante el tratamiento con ACOs.<sup>32</sup>

## **2.6 PCR en tiempo real.**

Es también denominada PCR cuantitativa. Se basa en detectar la fluorescencia emitida cuando se genera el fragmento específico durante la amplificación. Existen diversos formatos de detección que, en teoría, se pueden utilizar con todos los equipos de PCR en tiempo real (PCR-TR), aunque cada fabricante recomienda el formato más adecuado para su(s) sistema(s).<sup>33</sup>

El formato más sencillo para la realización de la PCR en tiempo real, es el que usa moléculas fluorescentes que se intercalan en el DNA de cadena doble, siendo la más utilizada SYBR® Green (menos tóxica que el bromuro de etidio).

El uso de intercaladores fluorescentes, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como que cualquier producto amplificado (específico o inespecífico) producirá fluorescencia o que no se puede utilizar para detectar productos múltiples, aunque hay técnicas para solventarlos.<sup>33</sup>

El resto de formatos de detección se basan en la hibridación de sondas internas con el fragmento amplificado, existiendo diversos sistemas de generación de la señal fluorescente. Dentro de estos sistemas, los más conocidos son los siguientes: Sondas Taqman®, Cebadores fluorescentes ("Molecular Beacons") y Doble sonda marcada o sondas de hibridación (sondas "Light Cycler").

### **2.6.1. Sondas Taqman®.**

Diseñadas por Applied Biosystems, hacen uso de la actividad 5' exonucleasa de la Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerasa. Estas sondas tienen un marcador fluorescente en el extremo 5' y una molécula que absorbe ("quencher") la fluorescencia emitida por el marcador en el otro extremo. La sonda hibrida con el fragmento específico (si está presente) y, a medida que se sintetiza la hebra complementaria al fragmento, la sonda se va degradando por la acción

exonucleasa, liberando el marcador que ahora sí emite fluorescencia (Figura 7).<sup>33</sup>

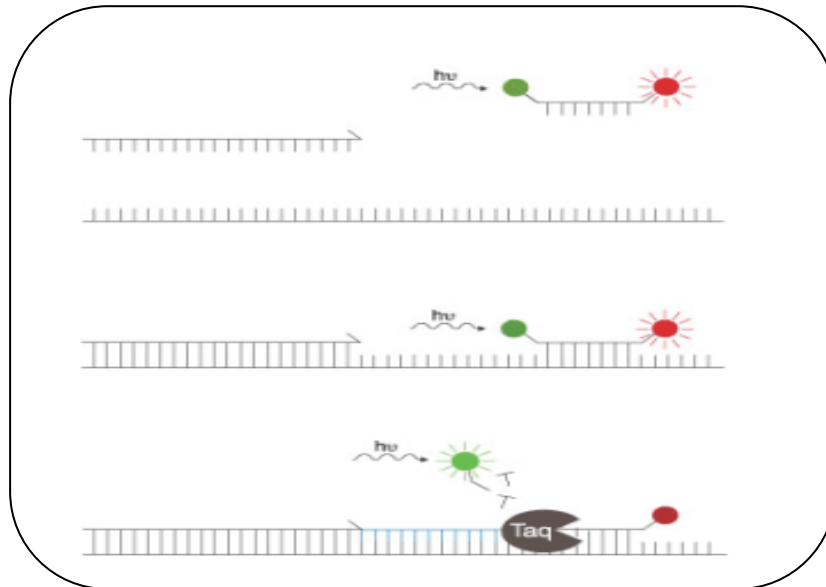


Figura 7. Principio de acción de las sondas Taqman en PCR en tiempo real.

### 2.6.2. Lectura e interpretación de los resultados de una PCR en tiempo real.

La visualización de los resultados se consigue mediante la integración de la señal fluorescente y se refleja en una curva de amplificación, considerándose que hay un resultado positivo cuando la señal emitida es superior al umbral establecido; el ciclo en que se considera que se obtiene la señal positiva está relacionado con la cantidad inicial de DNA molde que se coloca en el tubo para la reacción en el mix o cocktail. En la figura 8, se puede apreciar dos curvas modelo en la PCR-TR.<sup>33</sup>

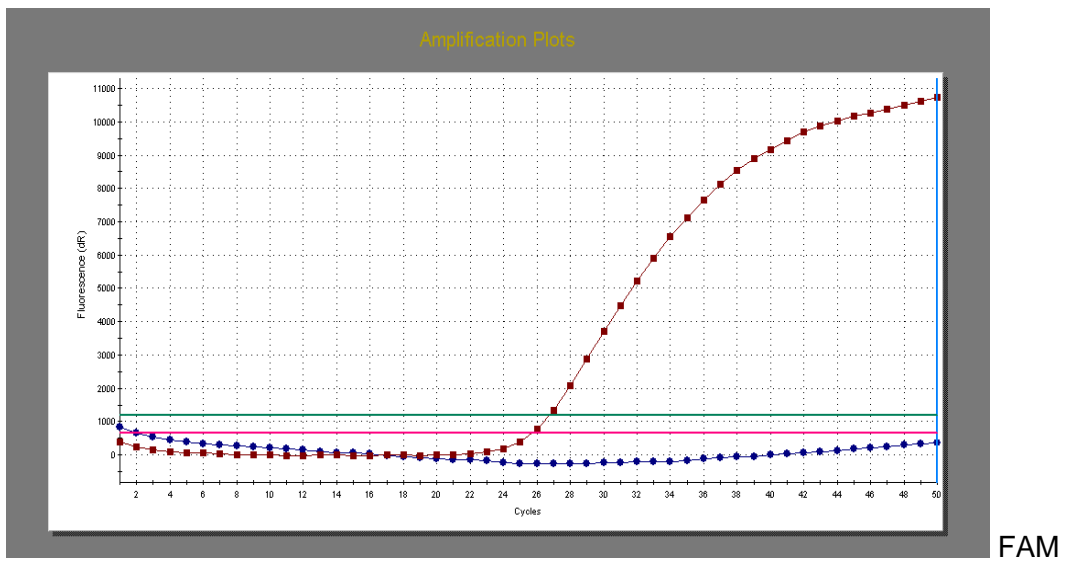
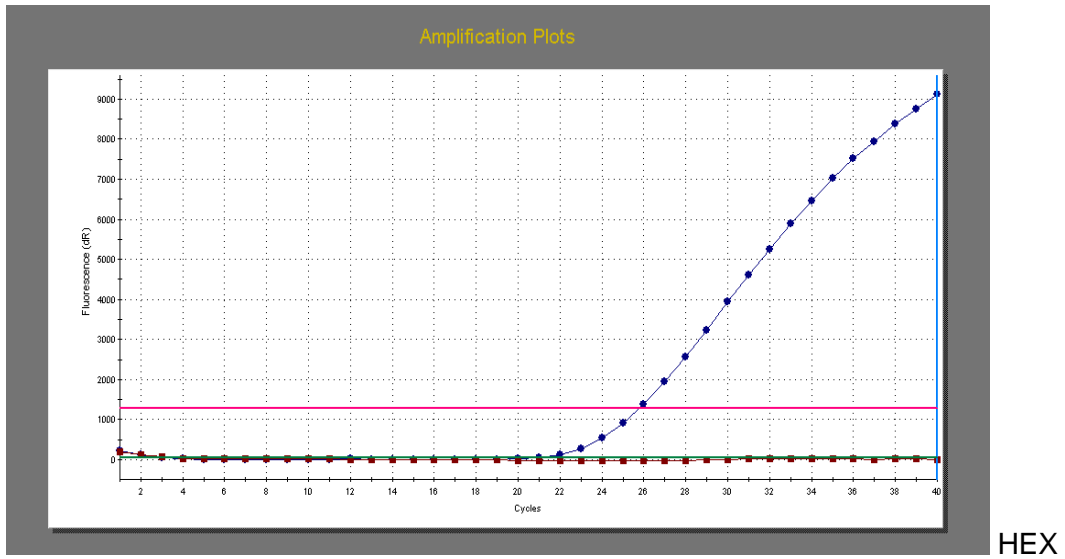


Figura 8. Curvas de los análisis multicomponentes de detección de alelos mediante sondas Taqman con fluoróforos FAM (rojo) y HEX (azul).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de trabajo de investigación**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática (CIBMB) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), durante los meses de noviembre de 2017 a marzo de 2018 en la ciudad de Ayacucho, Perú; y en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) del Departamento de Oncología Básico Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el mes de febrero de 2018.

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

##### **3.2.1. Población**

La población estuvo constituida por todos los pacientes atendidos en el Consultorio Externo de Neurología del Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, que fueron diagnosticados con epilepsia en los últimos cinco años antes del 2017.

- a. Diseño de investigación: No experimental, transversal y descriptivo.
- b. Unidad de análisis: Un paciente con epilepsia, cuyo diagnóstico fue realizado en el Consultorio Externo de Neurología del Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho.

- c. Marco muestral: Socios integrantes de la Asociación de Epilépticos de Ayacucho y otras instituciones.
- d. Diseño muestral: El procedimiento de selección de la muestra es de enfoque cualitativo, determinada durante o después de la inmersión inicial, ajustable en cualquier momento del estudio, no es probabilístico, no busca generalizar resultados, la muestra está determinada por el número de participantes voluntarios; denominada también autoseleccionada, ya que las personas se proponen como participantes en el estudio o responden activamente a una invitación y firma de un consentimiento informado.<sup>34</sup>

### **3.2.2. Muestra**

El tamaño de muestra estuvo conformado por 21 pacientes, cuyo diagnóstico de epilepsia fue realizado en el Consultorio Externo de Neurología del Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena”, y según los siguientes criterios:

#### **Criterios de Inclusión**

- Varones y mujeres (no embarazadas) con diagnóstico de epilepsia.
- Edad:  $\geq 07$  años.
- Firma de carta de consentimiento informado del paciente. Del padre o madre en caso de menores de edad (<18 años).

#### **Criterios de exclusión**

- Pacientes que no acepten ingresar al estudio.

#### **Criterios de eliminación**

- Muestras de sangre malograda y/o insuficiente.
- Abandono del estudio y/o retiro de la carta de consentimiento informado.



Una vez que el paciente aceptó ingresar en el presente estudio y firmó la carta de consentimiento informado, se le asignó un código para la identificación de su muestra y los resultados, con los siguientes datos:

- Año calendario de ejecución de la investigación.
- Número correlativo de ingreso del paciente al estudio.
- Procedencia: letras iniciales de la región, provincia y distrito.
- Letras iniciales de nombres y apellidos del paciente.

### **3.3 Aspectos éticos**

- a) Beneficencia:** En cada una de las etapas se trabajó, sin hacer abuso de nuestra posición, considerando que nuestro fin es investigar no debe pasar por encima de la dignidad humana.
- b) Privacidad:** La identidad de los participantes se mantuvo en estricta reserva y estuvo manejado solo por los investigadores, al igual que los datos obtenidos en todas y cada una de las encuestas.
- c) Consentimiento Informado:** Debido a que se trabajó con ellos se les informó de los objetivos que se quiere lograr y se pidió su apoyo el cual reafirmamos por medio del consentimiento informado.
- d) Autonomía:** Los pacientes decidieron voluntariamente participar.
- e) Veracidad:** Los datos obtenidos no se modificaron para lograr algún resultado o beneficio.

### **3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos**

#### **3.4.1 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

En cada paciente, se utilizó la técnica de la información y sensibilización de los beneficios del estudio, luego se aplicó un instrumento de ficha de datos y la firma del consentimiento informado del paciente que voluntariamente aceptó ingresar en el estudio (Anexo 2 y 3).<sup>34</sup>

### **3.4.2 Plan de procedimiento**

#### **A. Recolección de las muestras de sangre y obtención de paquete de glóbulos blancos.**

Se procedió a rotular los tubos para obtención de sangre (tapón color lila), con el código de identificación del paciente y fecha de extracción.

A cada paciente se le extrajo aproximadamente 4 mL de muestra de sangre venosa, en un tubo con anticoagulante etilen diamino tetra acético (EDTA), desechando la aguja en el contenedor para Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (R.P.B.I.).<sup>33</sup> Este tubo se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos (en centrífuga clínica básica) y se obtuvo un componente intermedio de ésta unidad de sangre total, constituida por un paquete de glóbulos blancos y plaquetas, conocido como “*buffy coat*”, el cual fue transferido a un tubo eppendorf estéril.

#### **B. Obtención de ADN genómico humano.**

Para la obtención del ADN genómico se utilizó el Pure Link™ Genomic DNA Kits de Invitrogen, con el siguiente protocolo.<sup>33</sup>

1. En un tubo estéril de microcentrífuga, se colocó 400 ul de “*buffy coat*”, se adicionó 30 ul de proteinasa k, se homogenizó en vórtex por 2 segundos y luego se llevó el tubo a la microcentrífuga para un “*spin down*”, por 5 segundos.
2. Luego se agregó 30 ul de RNAasa, se llevó a vórtex por 2 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos.
3. Se dejó al ambiente por dos minutos.
4. Se agregó 400 ul de buffer de lisis y luego se llevó al vórtex por 2 segundos.
5. Se incubó en baño María a 55 °C durante 30 minutos; se procedió a homogenizar manualmente cada 10 minutos.

6. Se añadió 400 ul de etanol de 96-100%, se homogenizó en vórtex por dos segundos.
7. Se transfirió 640 ul del lizado (la muestra en proceso) a una columna “*spin*” del kit, acoplado a otro tubo recolector, debidamente etiquetada.
8. Se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y medio.
9. Luego se colocó la columna (antes mencionada) en un nuevo tubo recolector y se desechó el tubo que contenía el filtrado.
10. Nuevamente, se transfirió el lizado restante, a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm durante un minuto y medio.
11. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se descartó en tubo colector que contenía el filtrado.
12. Se añadió en la columna 500 ul de la solución de lavado “*buffer 1*”, se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y medio.
13. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se descartó en tubo colector que contenía el filtrado.
14. Se agregó en la columna 500 ul de la solución de lavado “*buffer 2*”, se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y medio.
15. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se descartó en tubo colector que contenía el filtrado.
16. Se vertió en la columna 150 ul del buffer de elusión previamente calentado a 55 °C y se dejó en reposo durante un minuto a temperatura ambiente.
17. Se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y medio.
18. Se descartó la columna y se guardó el tubo colector que contenía el ADN purificado, debidamente etiquetado, en refrigeración a -20°C.

### **C. Cuantificación espectrofotométrica UV y determinación del volumen de carga de ADN genómico humano para PCR-TR.**

1. Se sacó del congelador, el tubo con la muestra de ADN y esperó que se descongele completamente a temperatura ambiente.
2. Se realizó un “*spin down*”, para asegurar que toda la muestra quede en el fondo del tubo.
3. Con la ayuda de una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ , se homogenizó las muestras de ADN, subiendo y bajando lentamente el 90% del volumen, por diez veces evitando la formación de espuma.
4. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
5. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril y se absorbió el agua utilizando papel “tissue”, se repitió dos veces.
6. Nuevamente se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener “cero de Absorbancia” (0.000 A°).
7. 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 y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel “tissue”.
8. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
9. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril, se secó con papel “tissue”.
10. El equipo arrojó el valor de la pureza del ADN, con el cual se determinó el volumen de carga para PCR-TR. Se apagó el equipo.<sup>33</sup>

#### D. Procesamiento del ADN genómico, para la identificación de los alelos.

Las muestras de ADN genómico obtenidas de cada paciente, se analizaron mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) en un equipo Applied Biosystems modelo Step One™, el cual cuenta con las siguientes características:

- Placa de 48 pocillos.
- Sistema Óptico LED con 3 filtros:  
(FAM™/SYBR Green®; VIC®/JOE™;ROX™)
- Velocidad normal y rápida.
- Volumen de Trabajo mínimo 10 µL.
- Notebook con el Software express v2.1 ó v3.0.

##### D.1. Sondas Taqman

Para la determinación de los alelos *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, se utilizaron sondas Taqman descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Sondas utilizadas para la determinación del genotipo de *CYP2C9* (Applied Biosystems Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assay).

Alelo	Código de identificación de la sonda	Secuencia de nucleótidos
<i>CYP2C9*2</i>	C_25625805_10	GATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC[C/T]G TGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCT
<i>CYP2C9*3</i>	C_27104892_10	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC[A/C]T TGACCTTCTCCCCAGCCTGCC

##### D.2. Condiciones para el PCR-TR

Para la preparación del cocktail, se utilizó la fórmula de la tabla 5.

Tabla 5. Fórmula de la preparación del cocktail para PCR-TR.

Componente	Volumen (µL) por reacción
Master Mix (2X)	5.4
Sonda Taqman (20X)	0.54
Agua Grado Biología Molecular	6.06 - "X"
ADN (ng/µL)	"X"
Volumen Total	12

La programación del termociclador, fue siguiendo el protocolo establecido por sondas Taqman C\_25625805\_10 y C\_27104892\_10 de Applied Biosystems Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assay, respectivamente.

### D.3. Interpretación de los resultados del PCR-TR

**Discriminación alélica:** Una vez concluida la reacción se observaron las curvas de amplificación de los alelos. La determinación de los alelos se realizó mediante la identificación de las curvas de amplificación, éstas dependen de la sonda utilizada y el compuesto fluoróforo con el que ha sido marcado, consecuentemente se determinó el genotipo de cada muestra de ADN estudiada, como se detalla en la tabla 7.<sup>33</sup>

Tabla 6. Tipos de fluorescencia y genotipos correspondientes obtenidos mediante PCR en tiempo real.

Fluorescencia Registrada	Genotipo
<b>CYP2C9*2</b>	
<b>Solo fluorescencia de HEX</b> Línea con puntos azules	Homocigoto para el alelo silvestre: (C/C)
<b>Solo fluorescencia de FAM</b> Línea con puntos rojos	Homocigoto para el alelo mutante: (T/T)
<b>Ambas fluorescencias</b> Ambas líneas: azul y roja	Heterocigoto: (C/T)
<b>CYP2C9*3</b>	
<b>Solo fluorescencia de HEX</b> Línea con puntos azules	Homocigoto para el alelo silvestre: (A/A)
<b>Solo Fluorescencia de FAM</b> Línea con puntos rojos	Homocigoto para el alelo mutante: (C/C)
<b>Ambas Fluorescencias</b> Ambas líneas: azul y roja	Heterocigoto: (A/C)

(Applied Biosystems Taqman® Drug Metabolism Genotyping Assay)

### **3.5. Análisis de datos**

Los datos fueron procesados con programa informático especializado de estadística SPSS V 23, en nivel descriptivo.

- Cálculo de razón (número de observaciones con un resultado).
- Índices o tasas de frecuencia.

Según Hernández.<sup>34</sup>

## **IV. RESULTADOS**



Tabla 7. Cuantificación y pureza de ADN genómico humano mediante espectrofotometría ultra violeta – Eppendorf BioPhotometer Plus, y determinación del volumen de carga para PCR tiempo real, de 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.

Nº	CÓDIGO DEL PACIENTE	CONCENTRACIÓN ADN µg/mL	PUREZA DE ADN		VOLUMEN DE CARGA DE ADN µL PARA PCR-TR
			Absorbancia		
			260/280	260/230	
1	2018-01-AHCA-PRÑF	21,635	1,76	0,92	1,4
2	2018-02-AHCA-YHMV	32,803	1,66	1,07	0,9
3	2018-03-AHCA-JMCH	42,114	1,64	0,36	1,0
4	2018-04-AHCA-IGA	26,919	1,94	0,66	1,1
5	2018-05-AHCA-ECSA	24,273	1,62	0,82	1,2
6	2018-06-AHCA-DQC	28,104	1,63	0,58	1,1
7	2018-07-AHCA-DFC	31,588	1,41	0,74	1,0
8	2018-08-AHCA-FMD	77,045	1,75	0,98	0,4
9	2018-09-AHCA-APV	50,550	1,67	0,57	0,6
10	2018-10-AHCA-ACHL	35,744	1,58	1,01	1,0
11	2018-11-AHCA-MGA	23,381	1,79	0,45	1,3
12	2018-12-AHCA-CPH	25,563	1,40	0,37	1,5
13	2018-13-AHCA-PSBV	54,961	1,68	0,67	0,5
14	2018-14-AHCA-NPA	27,950	1,69	0,66	1,1
15	2018-15-AHCA-EARC	37,133	1,68	0,76	0,8
16	2018-16-AHCA-FLSF	56,082	1,61	0,5	0,8
17	2018-17-AHCA-RLVE	41,348	1,49	0,54	1,0
18	2018-18-AHCA-YPD	57,880	1,69	0,93	0,5
19	2018-19-AHAY-GTIC	48,103	1,83	1,38	0,6
20	2018-20-AHAY-TYMT	70,472	1,81	1,5	0,4
21	2018-21-AHAY-MMH	46,275	1,73	0,8	0,6

Leyenda:

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

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

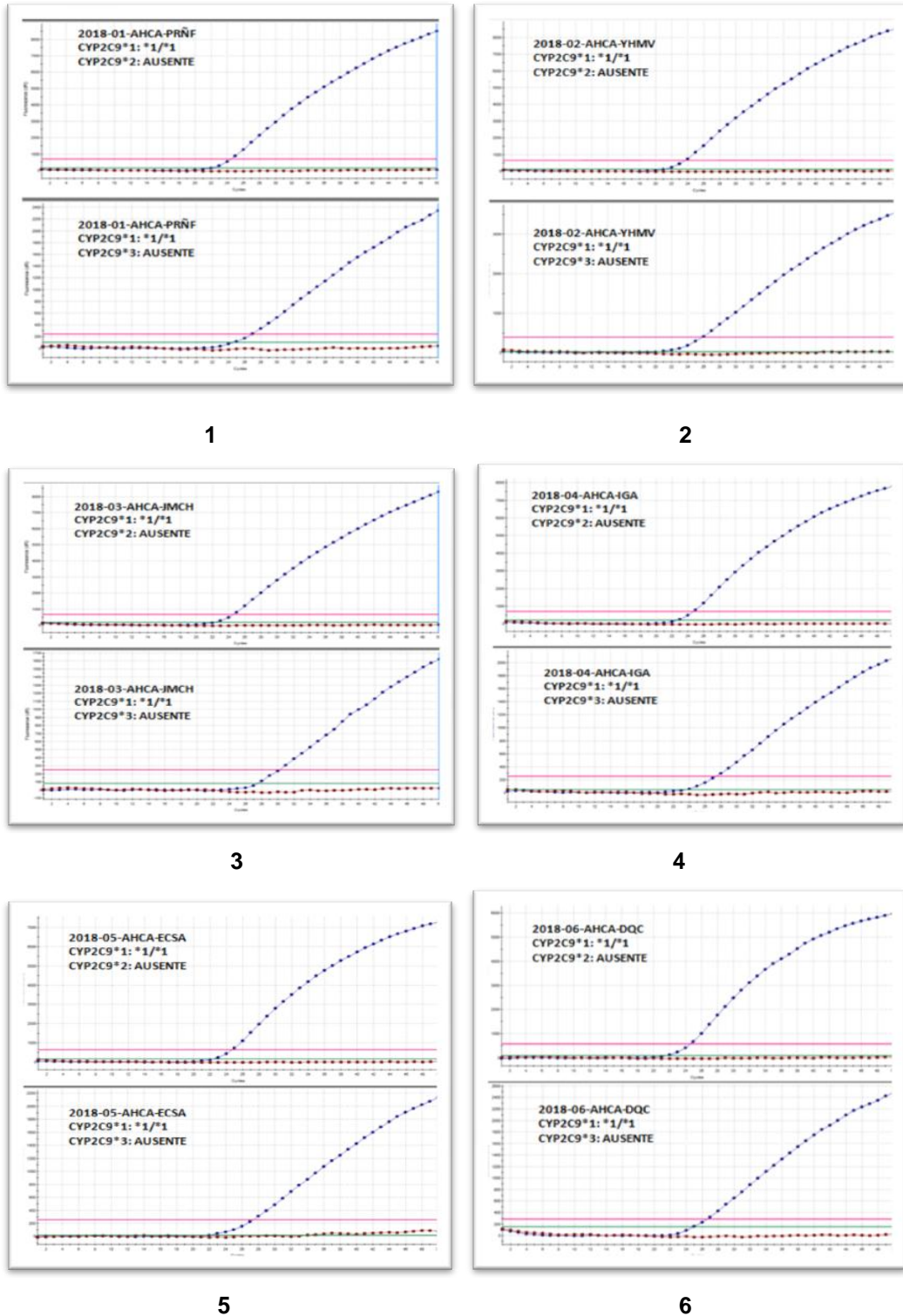
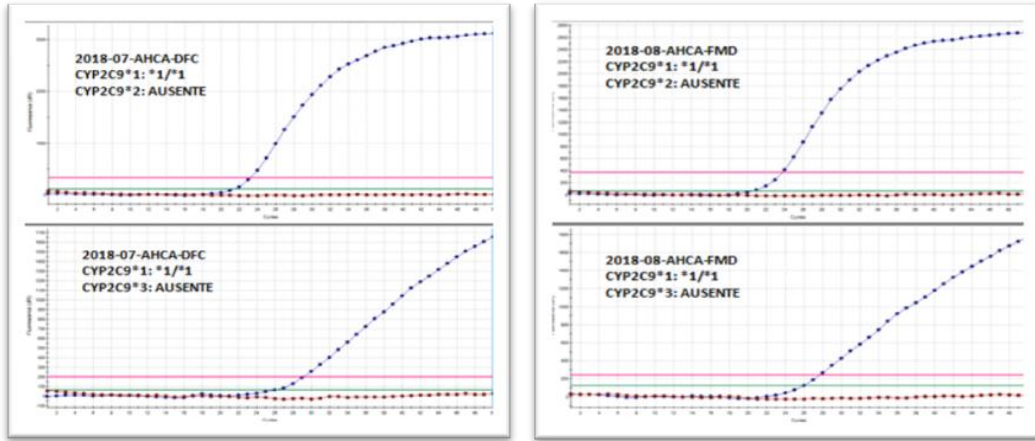
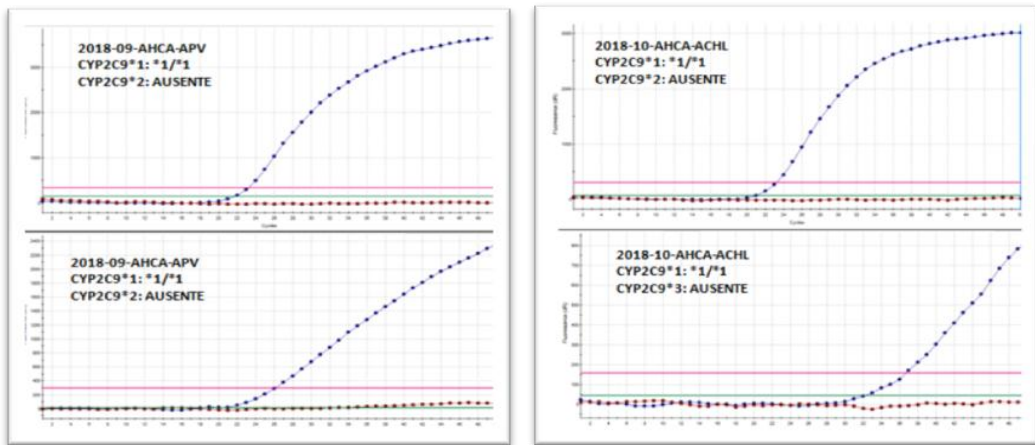


Figura 9. Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, de pacientes con epilepsia (de 1 al 6). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.



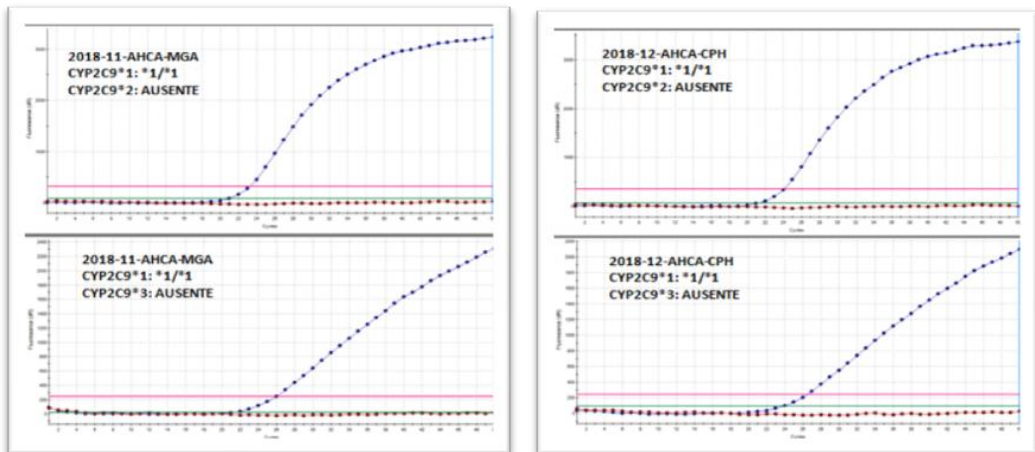
7

8



9

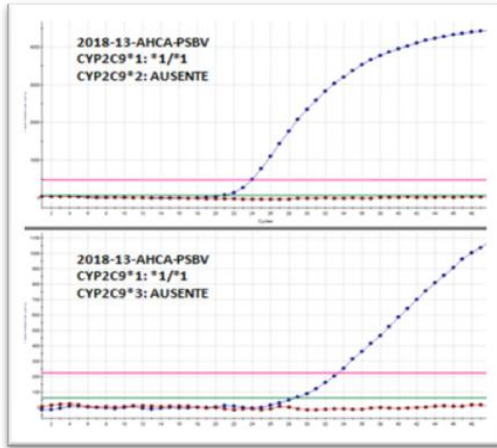
10



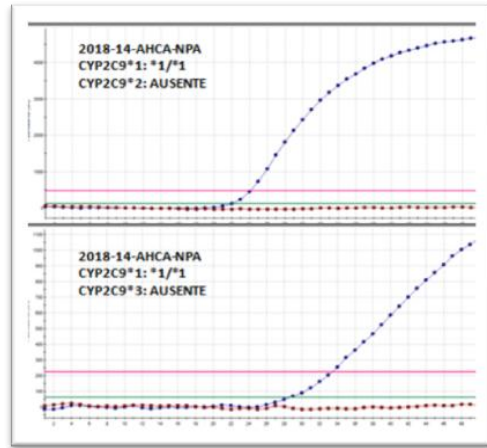
11

12

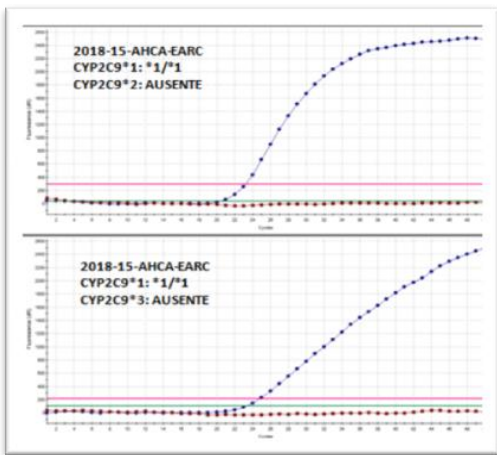
Figura 10. Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, de pacientes con epilepsia (de 7 al 12). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.



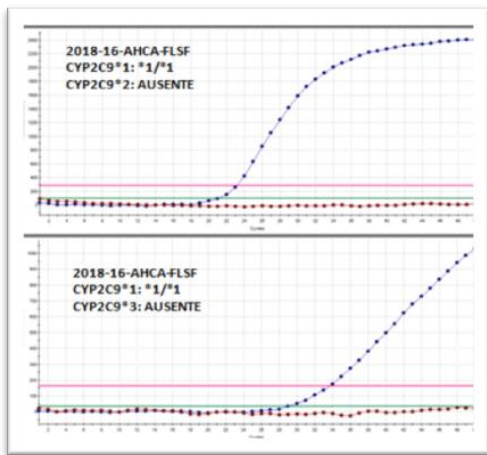
13



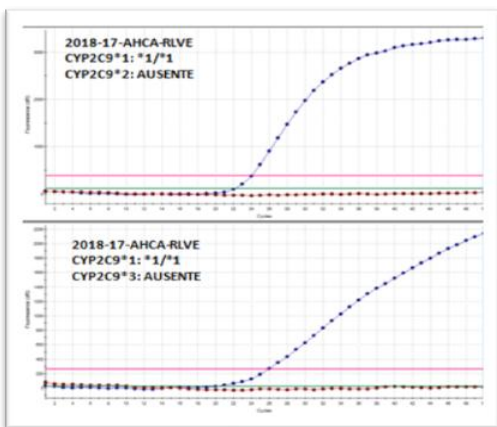
14



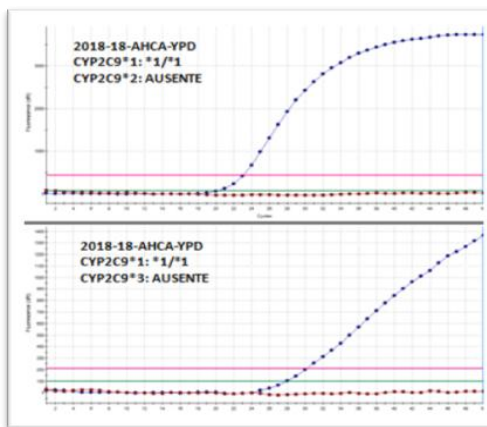
15



16

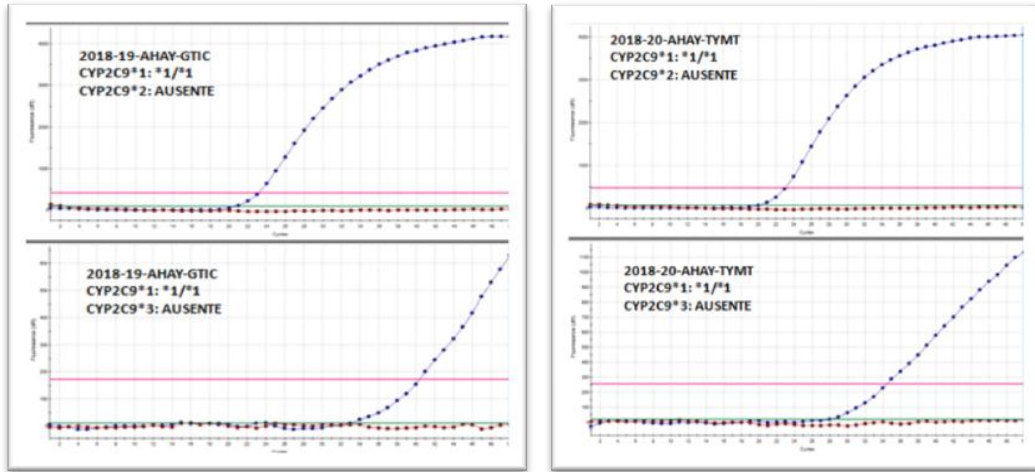


17



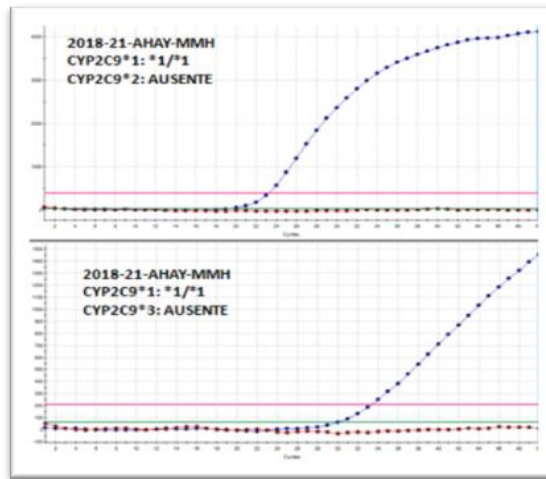
18

Figura 11. Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, de pacientes con epilepsia (de 13 al 18). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.



19

20



21

Figura 12. Imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, de pacientes con epilepsia (de 19 al 21). Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.

Tabla 8. Frecuencias alélicas y genotípicas del *CYP2C9*\*1, *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3 en 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.

Sonda Taqman	Alelos			Frecuencia Alélica	
	Homocigoto silvestre	Heterocigoto	Homocigoto Mutado		
	<b><i>CYP2C9</i> *2</b>	*1/*1 : C/C 21 (1.0)	*1/*2 : C/T 0 (0.0)	*2/*2 : T/T 0 (0.0)	*1 1.0
<b><i>CYP2C9</i> *3</b>	*1/*1 : A/A 21 (1.0)	*1/*3 : A/C 0 (0.0)	*3/*3 : C/C 0 (0.0)	*1 1.0	*3 0.0

Datos expresados:

n = Proporción de Individuos con un determinado genotipo del total de la población analizada.

Frecuencia alélica =  $\frac{(\text{Alelos homocigotos} \times 2 + \text{Alelos heterocigotos})}{\text{Sujetos totales} \times 2}$



Tabla 9. Determinación genotípica del gen *CYP2C9* para los alelos *CYP2C9*\*1, *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3; y fenotipo metabolizador para fenitoína en 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, 2018.

Nº de Orden	Código del Paciente	Genotipos :			Fenotipo Metabolizador para fenitoína
		Alelos <i>CYP2C9</i> *1	Alelos <i>CYP2C9</i> *2	Alelos <i>CYP2C9</i> *3	
1	2018-01-AHCA-PRÑF	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
2	2018-02-AHCA-YHMV	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
3	2018-03-AHCA-JMCH	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
4	2018-04-AHCA-IGA	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
5	2018-05-AHCA-ECSA	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
6	2018-06-AHCA-DQC	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
7	2018-07-AHCA-DFC	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
8	2018-08-AHCA-FMD	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
9	2018-09-AHCA-APV	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
10	2018-10-AHCA-ACHL	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
11	2018-11-AHCA-MGA	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
12	2018-12-AHCA-CPH	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
13	2018-13-AHCA-PSBV	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
14	2018-14-AHCA-NPA	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
15	2018-15-AHCA-EARC	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
16	2018-16-AHCA-FLSF	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
17	2018-17-AHCA-RLVE	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
18	2018-18-AHCA-YPD	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
19	2018-19-AHAY-GTIC	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
20	2018-20-AHAY-TYMT	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal
21	2018-21-AHAY-MMH	Homocigoto *1/*1	Ausente	Ausente	Normal

Leyenda:

Homocigoto \*1/\*1: Genotipo homocigoto silvestre.

## V. DISCUSIÓN

La epilepsia fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad crónica desatendida, con elevada prevalencia en países de pobres recursos; por tanto, en Ayacucho no estamos ajenos a ésta situación, por lo que con el presente estudio, alcanzamos los resultados con el propósito de generar datos que aporten al mejor conocimiento de esta enfermedad en nuestra región y la finalidad de optimizar el tratamiento de este mal en cada uno de los pacientes.

La Tabla 7, reporta los resultados de la cuantificación y pureza de ADN genómico humano mediante espectrofotometría ultra violeta – Eppendorf BioPhotometer Plus, de las muestras de los 21 pacientes que ingresaron al estudio, estos valores varían entre 21,635  $\mu\text{g/mL}$  y 77,045  $\mu\text{g/mL}$ , ésta variación se debe a diferentes causas, siendo las más determinantes la cantidad de glóbulos blancos presentes en la muestra de sangre de cada paciente, por su estado nutricional o grado de parasitismo, entre otros factores; por otro lado, puede deberse también al manejo del procedimiento en el trabajo de laboratorio. Así mismo se ha determinado la pureza del ADN obtenido, que resulta del cociente del valor de la absorbancia a 260  $\text{A}^\circ$  (para ADN) sobre la absorbancia a 280  $\text{A}^\circ$  (para proteínas), si lo óptimo debe estar en el rango de 1,8 a 2,0 las



muestras obtenidas están en rango permisible y se debe tomar en cuenta para determinar el volumen de carga para el PCR.

La determinación del volumen de carga de ADN genómico, de cada muestra para PCR tiempo real, es un factor muy importante en el proceso de replicación del fragmento en estudio; sobre todo si es insuficiente, podría no mostrar los resultados esperados; por tanto, estos han sido calculados para llevar al cocktail, a una concentración aproximada de 1000 µg/mL de ADN en un volumen final de 12 µL.

Las figuras 9, 10, 11 y 12, constituyen las imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, para la determinación de los alelos *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, de cada uno de los 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel Ángel Mariscal Llerena de Ayacucho, 2018. En el reporte de cada paciente hay dos curvas:

a) En la parte superior, la curva de color azul por la luminiscencia del fluoróforo HEX, corresponde a la replicación de los fragmentos de *CYP2C9\*1*, es decir el silvestre o *Wild Type*; es homocigoto, porque solo está la curva azul y ausencia de curva de color rojo, por la luminiscencia del fluoróforo FAM que corresponde al mutante *CYP2C9\*2*.

b) En la parte inferior, igualmente, la curva de color azul es por la luminiscencia del fluoróforo HEX, corresponde a la replicación de los fragmentos de *CYP2C9\*1*, es decir el silvestre o *Wild Type*; es homocigoto, porque solo está la curva azul y ausencia de curva de color rojo, por la luminiscencia del fluoróforo FAM que corresponde en éste caso al mutante *CYP2C9\*3*.

En cada una de las imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real: la línea de color verde, corresponde al control de las reacciones en cadena de la polimerasa, y la línea de color rosado marca el límite del “umbral” a la cual debe sobre pasar, las curvas de cuantificación de la replicación.

Si bien, el reporte de todas las muestras presentan una curva de color azul, estas no son iguales una con otra, pues varían en el punto de partida respecto a la línea del número de ciclo y en la pendiente que describe la curva respecto a la fluorescencia que va directamente relacionada al número de replicaciones del fragmento de ADN; esto es debido, principalmente, a la concentración de ADN molde presente en el tubo de la reacción, que constituye el “molde” para los procesos de replicación. Las imágenes de mapa de bits de PCR tiempo real, de cada uno de los pacientes revelan que se ha llevado a cabo una buena reacción de las muestras procesadas.

Todas las muestras corresponden a alelos silvestres, no hubo ningún paciente que al menos presente un solo alelo mutante ya sea para *CYP2C9\*2* tampoco *CYP2C9\*3*, estos resultados se interpretan como prevalencia del alelo silvestre en los pacientes que ingresaron al estudio, todos ellos ayacuchanos, en el entendido genérico que son del grupo étnico andino o mestizo, este último que resulta de la mezcla de raza española con la andina.

Por otro lado, Dorado<sup>9</sup>, resume las frecuencias alélicas del *CYP2C9\*2* en diferentes poblaciones del mundo; España, Francia y Estados Unidos (caucásicos) reportan las mayores frecuencias con 0.16, 0.15 y 0.15 respectivamente; seguidos de Alemania (0.14), Italia, Reino Unido, Dinamarca, Brasil (caucásicos) y Egipto con 0.13, y en menor frecuencia en poblaciones de Canadá (amerindios), Corea, China, Japón y Taiwán. Del mismo modo, en el caso del gen *CYP2C9\*3* detalla que las poblaciones con mayor frecuencia corresponden a Reino Unido y Turquía (> 0.100); España, Italia e Irán (0.100); India, Malasia, Francia, Brazil y Bélgica (< 0.1).

En la tabla 8, se reporta las frecuencias alélicas y los genotipos del *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* de los 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, que ingresaron al

estudio. Los resultados del PCR en tiempo real con las sondas Taqman para *CYP2C9\*2* arrojan las siguientes frecuencias: homocigoto silvestre \*1/\*1:C/C, 21 (1.0); heterocigoto \*1/\*2:C/T, 0 (00); homocigoto mutado \*2/\*2:T/T, 0 (00). Del mismo modo, con las sondas Taqman para *CYP2C9\*3* arrojan las siguientes frecuencias: homocigoto silvestre \*1/\*1:A/A, 21 (1.0); heterocigoto \*1/\*3:A/C, 0 (00); homocigoto mutado \*3/\*3:C/C, 0 (00).

En México, Durango, Gutiérrez<sup>10</sup>, el año 2012, estudió, una población de 50 pacientes con diagnóstico de epilepsia y bajo el tratamiento con fenitoína, de los cuales: 24 (48%) fueron mujeres en edades comprendidas de los 18 a 78 años y 26 (52%) varones en edades comprendidas de los 22 a 64 años. Determinó que la frecuencia del alelo *CYP2C9\*2* fue de 0.12, detectado en 12 pacientes con genotipo heterocigoto (\*1/\*2); mientras que, la frecuencia del alelo *CYP2C9\*3* fue de 0.04, encontrado en 4 pacientes con genotipos heterocigotos (\*1/\*3).

En Perú, el trabajo de tesis Epidemiología de la epilepsia en el Perú: Neurocisticercosis como causa de epilepsia secundaria en la región norte del Perú, realizado por Moyano<sup>11</sup>, De 256 pacientes asintomáticos que tuvieron una tomografía axial computarizada (TAC) cerebral sin contraste, 48 (18%) tuvo una NCC calcificada. La prevalencia de epilepsia encontrada fue de 17.25/1000 habitantes y la proporción de NCC en personas con epilepsia fue de 39% (109/282). La prueba de Western Blot (EITB-LLGP) para cisticercosis fue positivo en el 40% de los individuos con epilepsia y en el 36.9% de la población general. La asociación entre cisticercosis y epilepsia tuvo un OR de 2.7 (95% CI 2.1-3.6,  $p < 0.001$ ).

En la tabla 9, se reporta el genotipo del gen *CYP2C9* con los alelos *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*; consecuentemente el fenotipo metabolizador de fenitoína, de los pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital General "Miguel A. Mariscal Llerena" de Ayacucho, que ingresaron al estudio. Los 21 pacientes

que ingresaron al estudio, todos presentan genotipo homocigoto silvestre \*1/\*1:C/C para el gen *CYP2C9*, no se determinó ningún paciente con genotipo mutante con alelos *CYP2C9*\*2 ni *CYP2C9*\*3; por tanto, todos los pacientes que ingresaron al estudio tienen el fenotipo metabolizador normal para fenitoína. Quiere decir, que todos los pacientes se encuentran en condiciones genéticas favorables de recibir tratamiento con fenitoína, por poseer el gen *CYP2C9*, que se expresa en la producción de enzimas que metabolizan adecuadamente la fenitoína, para los efectos de cumplir su función farmacodinámica y su consecuente excreción del organismo.

Soo-Youn Lee<sup>6</sup> en Korea, estudió la repercusión de la presencia de las formas alélicas \*2 y \*3 de *CYP2C9* y *CYP2C19* en el metabolismo de DFH en 97 pacientes epilépticos, explicando que hay 39.6% de la varianza de los niveles séricos de DFH en los individuos con la presencia de alguno de estos polimorfismos. Haciendo evidente la necesidad de análisis farmacogenéticos en los pacientes, para el mejorar el ajuste de la dosis.

Por otro lado, Mamiya<sup>7</sup> señaló que las concentraciones séricas de DFH en pacientes japoneses, con el alelo *CYP2C9*\*3, incrementan dramáticamente las concentraciones de DFH aún con dosis bajas, y los pacientes con los alelos \*2 y \*3 deben ser tratados cuidadosamente si sus dosis son elevadas, ya que se incrementan fácilmente debido a la saturación del sistema enzimático.

Así mismo, la repercusión en el metabolismo de la fenitoína fue corroborada en Holanda, Van der Weide<sup>8</sup>, determinó el efecto de los genotipos *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3 sobre la dosis de fenitoína en relación con la concentración sérica, investigó en un grupo de 36 pacientes holandeses con diagnóstico de epilepsia que estaban recibiendo DFH a largo plazo. Los pacientes portadores de al menos un alelo mutante requirieron una dosis de mantenimiento 37% menor de fenitoína para alcanzar una concentración terapéutica, en comparación con los

pacientes homocigotos para el alelo silvestre. Una dosis de mantenimiento inferior a 200 mg/día fue suficiente para alcanzar una concentración sérica de DFH eficaz en los portadores de alelos mutantes, mientras que en los pacientes con genotipo silvestre la dosis requerida fue > 300 mg/día para alcanzar niveles terapéuticos.

Los datos de la Oficina general de Estadística del Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena” de Ayacucho reporta la morbilidad general de epilepsia, en consulta externa, por subcategoría según CIE 10 para el año 2016 hubo 844 casos y el año 2017 registró 1,069 casos de epilepsia en sus diferentes formas, como se detalla en las tablas 1 y 2. A todas luces, estas cifras son altas y preocupantes, más aún cuando ésta enfermedad está siendo desatendida.

Nuestros resultados constituyen una base de datos muy importantes para ser tomado en cuenta por los médicos en el tratamiento de estos pacientes enfermos de epilepsia, con fenitoína; además de servir como referencia de los genotipos del gen *CYP2C9* presentes en la población ayacuchana.

## VI. CONCLUSIONES

- El análisis del polimorfismo del gen *CYP2C9* en los 21 pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho en 2018, revelan ser todos genotipo *CYP2C9*\*1.
- Los alelos identificados en los 21 pacientes con epilepsia que ingresaron al estudio son alelos homocigoto \*1/\*1, silvestre o Wild type.
- Los 21 pacientes que ingresaron al estudio, todos presentan el fenotipo metabolizador normal para el fármaco fenitoína.
- Las frecuencias alélicas del gen *CYP2C9*, en la población estudiada es de 21 (1.0) para *CYP2C9*\*1, 0 (0.0) para *CYP2C9*\*2 y 0 (0.0) para *CYP2C9*\*3.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Desarrollar trabajos de farmacogenética con otros genes, relacionados al metabolismo de otros fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia.
- Ampliar los estudios realizando la farmacocinética de la fenitoina en los pacientes que ingresen al estudio.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher RS, Van Emde BW, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizure and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy and the International Bureau of Epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46: 470–472.
2. Caraco Y, Muszkat M, Wood AJ. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of CYP2C9 activity in vivo. *Pharmacogenetics* 2001;11: 587-596.
3. Finkel R, Michelle A, Cubeddu X. Farmacología. *Epilepsia* 15 LipincottWilliams& Wilkins. 4a edición 2009 171-182.
4. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*. 2006 Apr; 20;440:1073-7.
5. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392:1093-108.
6. Soo-Youn Lee, Seung-Tae Lee and Jong-Won Kim. Contributions of CYP2C9/CYP2C19 genotypes and drug interaction to the phenytoin treatment in the Korean epileptic patients in the clinical setting. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 40: 448-452.
7. Mamiya K, Leiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imal J, Ninomiya H, Yamada H. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: study in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia*. 1998; 39:1317-1323.
8. Van der Weide J., Steijns L. S., Van Weelden M. J., DeHaan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics*. 2001;11:287-291.
9. Dorado P, Sosa-Macias MG, Peñas-Lledó EM, Alanis-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, Lares-Asseff I, Llerena A. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11:108-12.
10. Gutiérrez O. Asociación de los Haplotipos del *CYP2C9* \*2, \*3 y del *CYP2C19* \*2, \*3, el Estado Nutricional y el Tratamiento Concomitante con la



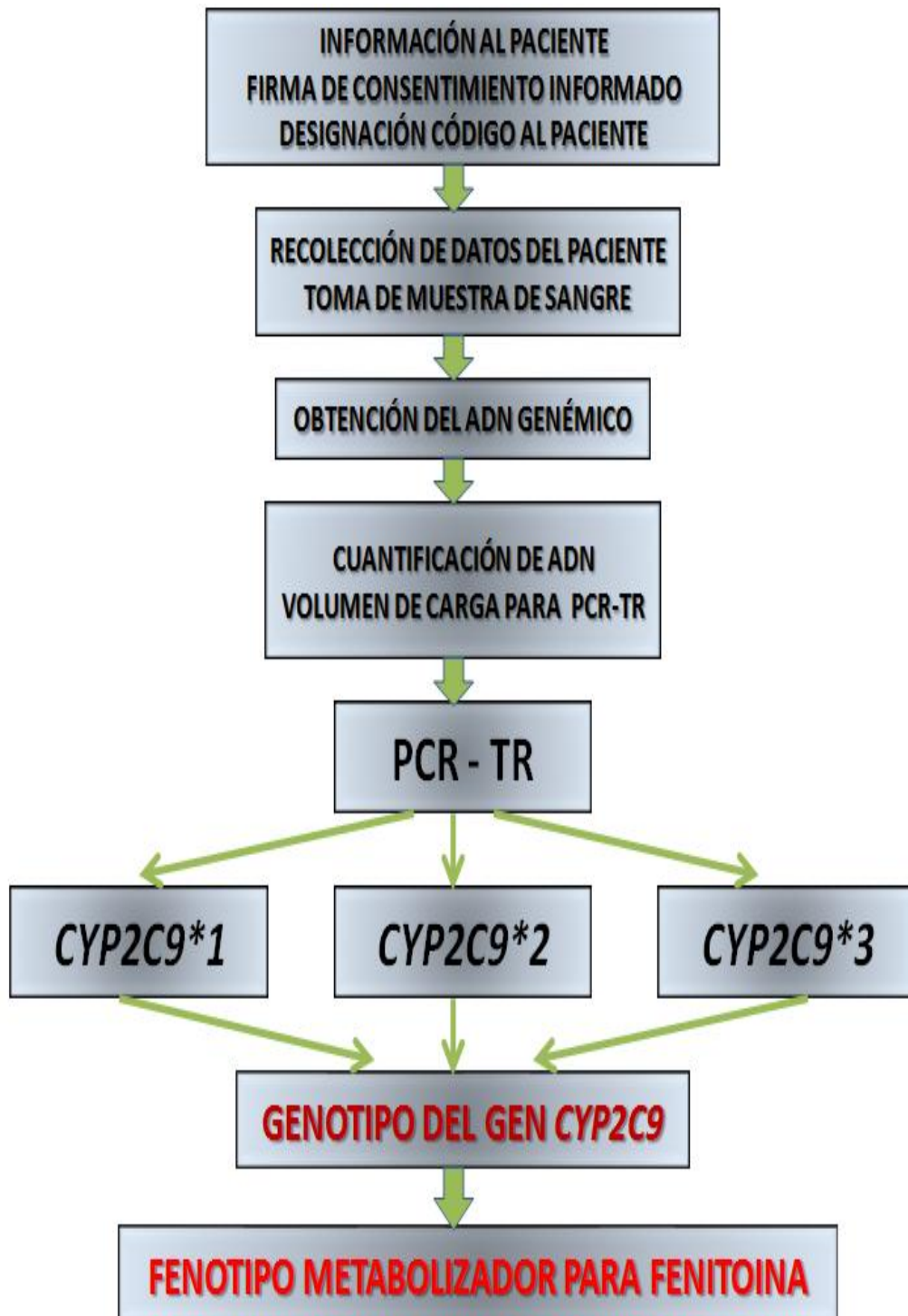
Farmacocinética de Fenitoína y la respuesta al tratamiento en pacientes con epilepsia de Durango, México.

11. Moyano Vidal L,M Epidemiología de la epilepsia en el Perú:Neurocisticercosis como causa de epilepsia secundaria en la región norte del Perú. 22 septiembre 2016 Lima.
12. Burneo JG (2003) Sonko-Nanay and epilepsy among the Incas. *Epilepsy Behav* 4: 181-184.
13. World Health Organization. Estrategia y plan de acción sobre epilepsia. OPSOMS [Internet]. Washington; 2011;25. Available from: [http://www.paho.org/hq/dmdocuments/epilepsia\\_doc.pdf](http://www.paho.org/hq/dmdocuments/epilepsia_doc.pdf)
14. Laine K, Yasar U, Widen J, Tybring G. A screening study on the liability of eight different female sex steroids to inhibit CYP2C9, 2C19 and 3A4 activities in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*. 2003;93:77-81.
15. Suzuki Y, Shioiri T, Muratake T, *et al*. Effects of concomitant fluvoxamine on the metabolism of alprazolam in Japanese psychiatric patients: interaction with CYP2C19 mutated alleles. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 58: 829-33.
16. Engel J Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42:796-803.
17. Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, Lai X, Wang JC, Li CG, Tian M, Duan W Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab*. 2008; 9:738-84.
18. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007; 116:496-526.
19. Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21:263-5.
20. Salazar-Zúñiga A, Ramos-Díaz E, Aguilar-Hipólito R, Hernández-Pedraza J. Incidencia de Epilepsia en el Hospital Central Militar de 1996 a 2001. Estudio retrospectivo de revisión. *Neurol Neurocir Psiquiat* 2004; 37: 19–24.
21. Berg A. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 2010; 51(4):676–685.

22. Goldensohn ES, Porter RJ, Schwartzkroin PA: The American Epilepsy Society: an historic perspective on 50 years of advances in research. *Epilepsia* 1997;38:124-50.
23. Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005; 46:858–877.
24. Salazar-Zúñiga A, Ramos-Díaz E, Aguilar-Hipólito R, Hernández-Pedraza J. Incidencia de Epilepsia en el Hospital Central Militar de 1996 a 2001. Estudio retrospectivo de revisión. *Neurol Neurocir Psiquiat* 2004; 37: 19–24.
25. Anderson GD. Pharmacokinetics, pharmacodynamic, and pharmacogenetic targeted therapy of antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit.* 2008;30(2):173-180.
26. Farré M, Salvá P. Monitorización de niveles plasmáticos de fármacos. *Medicine* 1995;6:145-157.
27. Oficina General de Estadística del Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena”. Ayacucho, Perú.
28. Hang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5 ed. São Paulo: Elsevier; 2003.
29. Poolsup N, LiWan A, Knight TL Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. *J Clin Pharm Ther* 2000;25:197-220.
30. Martinus C. Feiters, Alan E. Rowan and Roeland J. M. Nolte. From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. *Chem Soc Rev.* 2000 29, 375–384.
31. Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem.* 2008;392:1075-84.
32. Hagmann M. Human genome. A good SNP may be hard to find. *Science* 1999; 285: 21-22.
33. Miranda T, Valer G. *Protocolos de Biología Molecular*. Editorial Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2016.
34. Hernández R, Fernández C, Baptista P. *Metodología de la Investigación*. Quinta edición. Perú. Editorial Mc Graw Hill. 2010.

## **IX. ANEXOS**

## Anexo 1



Flujograma para la determinación del gen *CYP2C9*, alelos: *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2*, y *CYP2C9\*3*, mediante PCR en tiempo real; y fenotipo metabolizador.

## Anexo 2

### CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUAL PARA COMUNIDADES NATIVAS Y MESTIZAS

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

#### Presentación

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

#### ¿Cuál es el propósito de esta investigación?

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

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

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

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

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

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



Página 3

Carta de consentimiento informado individualizado



Para formar parte del proyecto, usted debe:

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

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

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

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

#### **¿Qué pasará con mi muestra?**

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

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

#### **¿Cuáles son los beneficios de participar en el proyecto?**

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

#### **¿Cuáles son los riesgos de participar?**

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

#### **¿Cómo protegerán mi privacidad?**

Protegeremos su privacidad de diferentes maneras:

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

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



Página 4

Carta de consentimiento informado individualizado.

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

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

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

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

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

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

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

**Estoy de acuerdo:**

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

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

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Firma del participante: \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

¿Se le otorgó copia al participante?: Sí No



Huella digital

Nombre y firma del Investigador \_\_\_\_\_

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



Página 5

Carta de consentimiento informado individualizado.

### Anexo 3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA

#### TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

## **POLIMORFISMO DEL GEN *CYP2C9* Y FENOTIPO METABOLIZADOR DE FENITOINA EN PACIENTES CON EPILEPSIA ATENDIDOS EN EL HOSPITAL REGIONAL “MIGUEL A. MARISCAL LLERENA”, AYACUCHO 2018.**

### FICHA DE DATOS DEL PACIENTE

Fecha de toma de muestra: .....

#### **CÓDIGO DEL PACIENTE:**

				-				-						-			
--	--	--	--	---	--	--	--	---	--	--	--	--	--	---	--	--	--

#### **I. DATOS GENERALES:**

1. Nombre del Paciente .....  

Apellido paterno
Apellido materno
Nombres

2. Edad:..... 3. Sexo:.....

4. Grado de Instrucción:.....

5. Ocupación:..... 6. Documento de Identidad: .....

7. Domicilio:.....  
Avenida, Jr. Calle o manzana

8. Referencia de domicilio:.....

9. Localidad:..... 10. Distrito:.....

11. Tiempo de residencia:..... 12. Procedencia:.....

#### **II. ENFERMEDAD ACTUAL:**

13. Tipo de enfermedad:..... 14. Tiempo de enfermedad:.....

15. Tiempo de tratamiento: .....

16. Observaciones: .....

#### **III. ANTECEDENTES DE ENFERMEDAD:**

17. Enfermedades anteriores: .....

18. Tratamiento: .....

19. Observaciones: .....

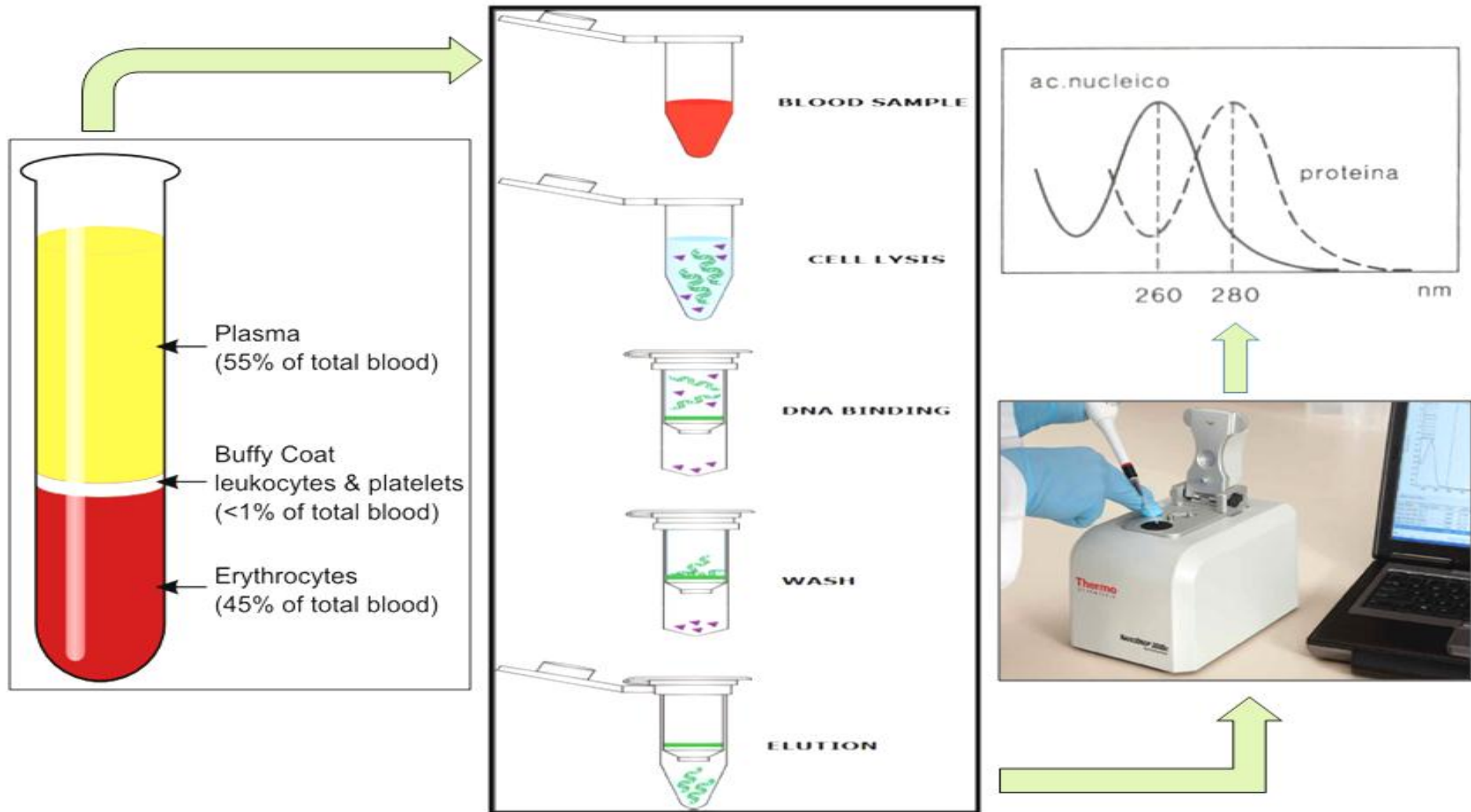
.....  
Firma del investigador.



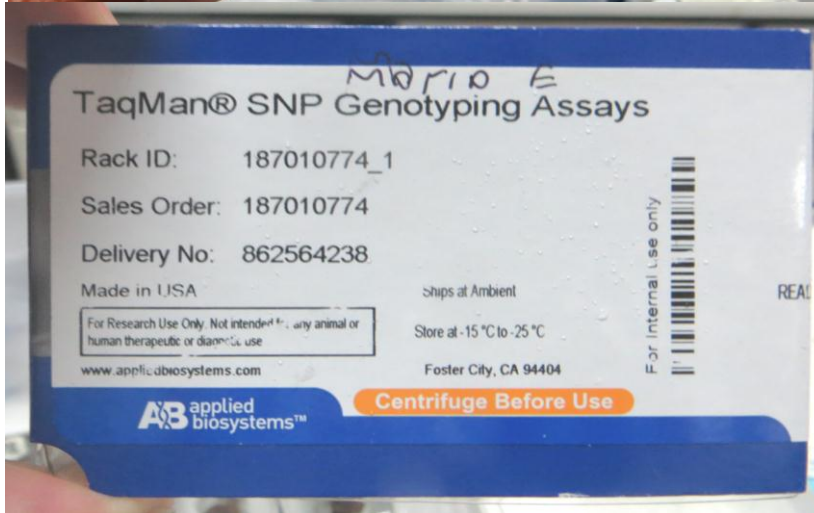
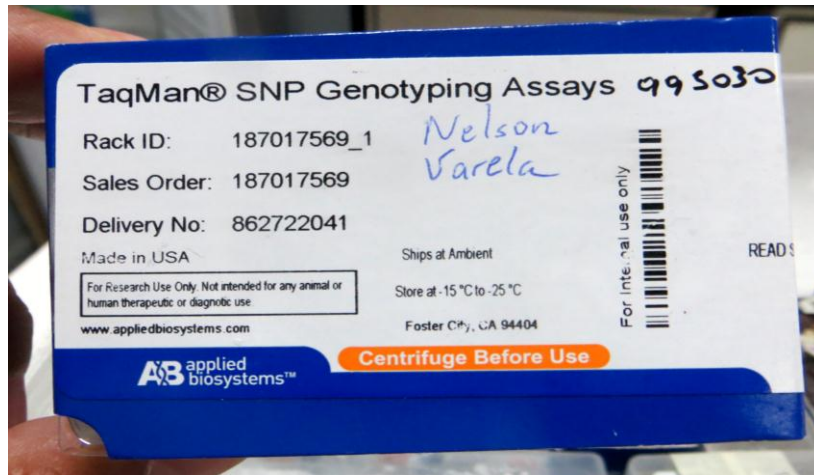
Anexo 4  
TOMA DE MUESTRA DE SANGRE Y OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO



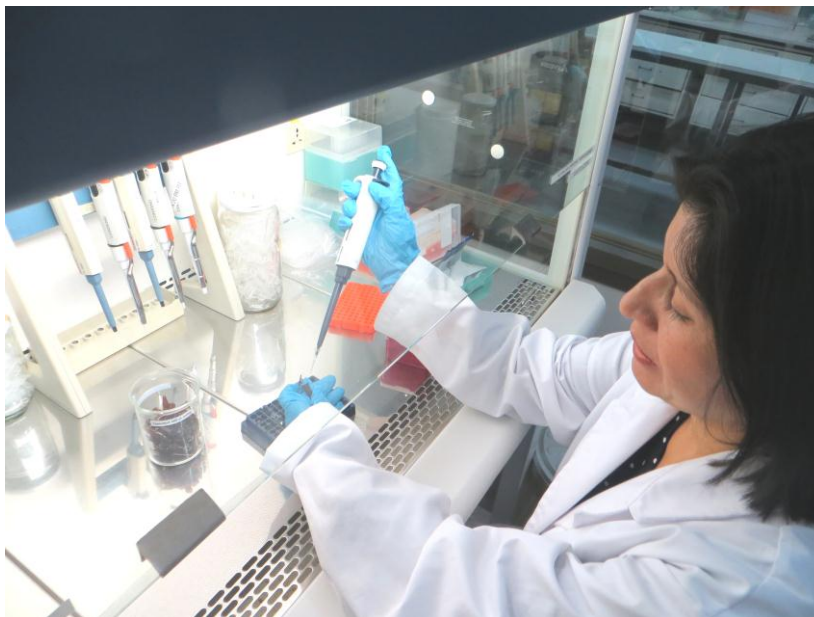
**ANEXO 5**  
**OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO HUMANO Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA U.V.**



Anexo 6



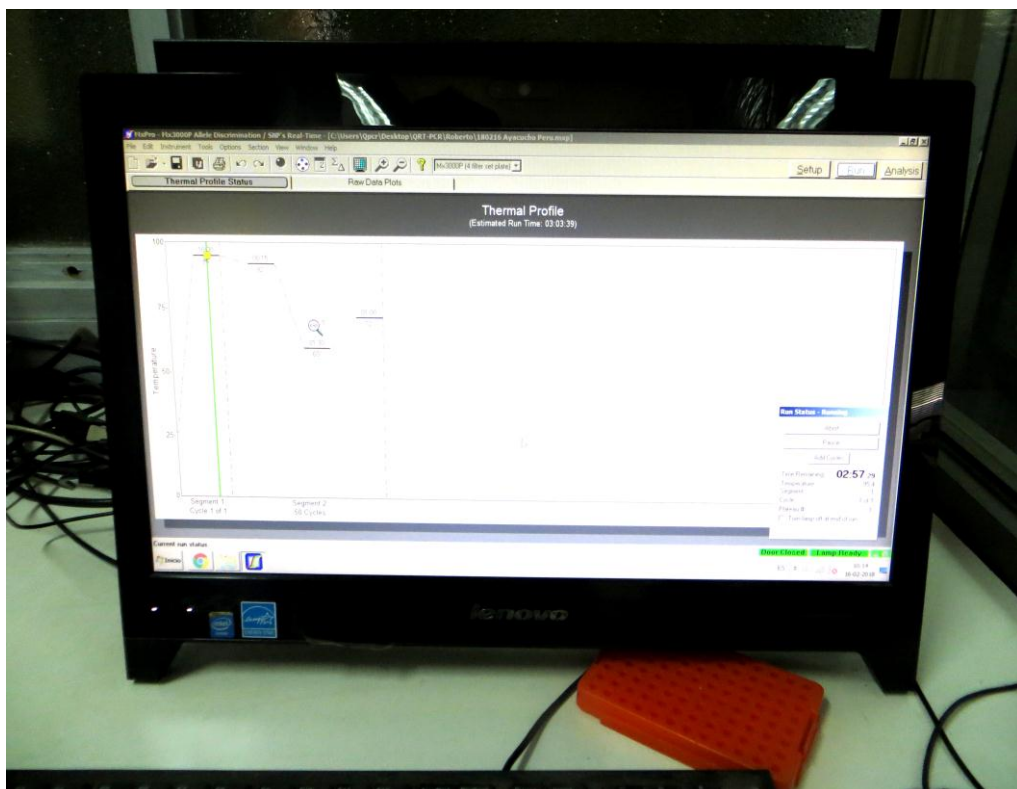
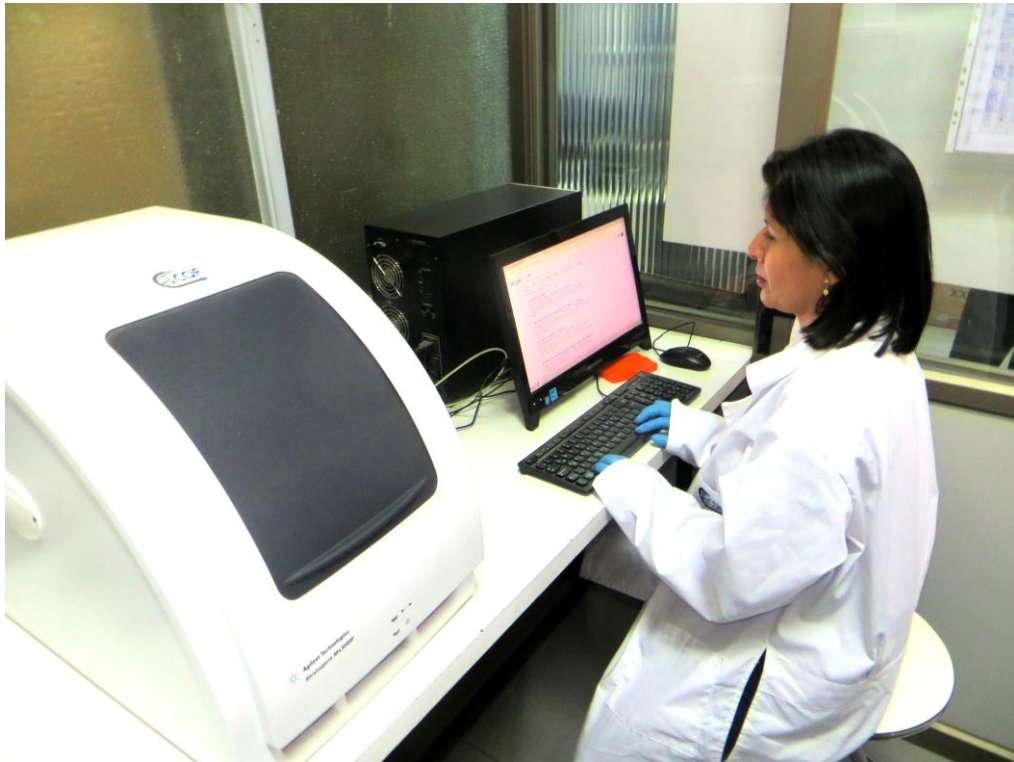
SONDAS TAQMAN



CABINA PRE-PCR, PREPARACIÓN DEL "MIX" PARA PCR-TR.

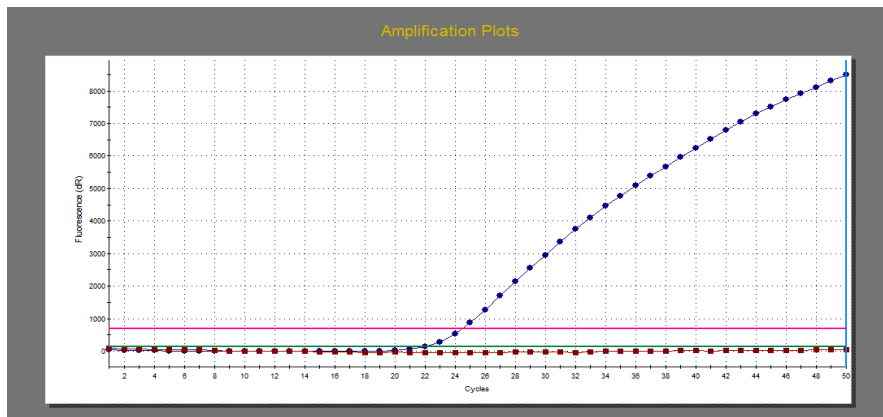
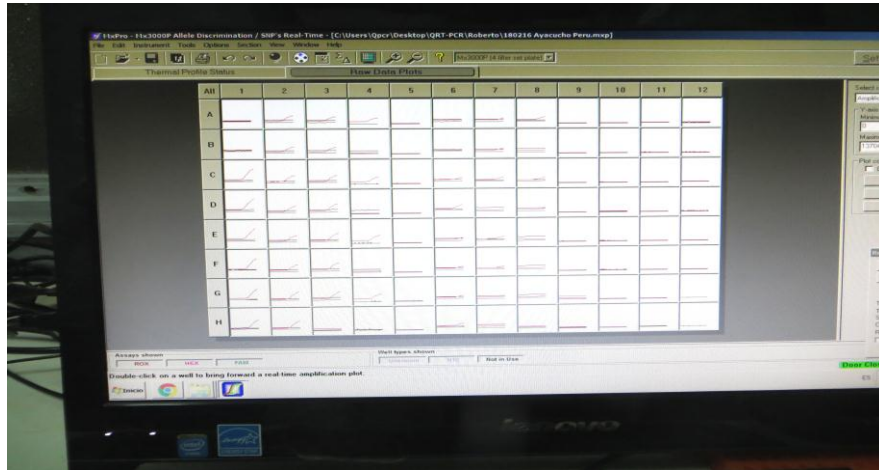


## Anexo 7



**PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR PARA PCR-TR.**

## Anexo 8



**IMÁGENES DE MAPA DE BITS DE PCR TIEMPO REAL, PARA LA DETERMINACIÓN DE *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* Y *CYP2C9\*3*, DE PACIENTES CON EPILEPSIA. HOSPITAL GENERAL "MIGUEL ÁNGEL MARISCAL LLERENA" DE AYACUCHO, 2018.**



**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN**

**Anexo 9  
MATRIZ DE CONSISTENCIA**

**TITULO: Polimorfismo del gen *CYP2C9* y fenotipo metabolizador de fenitoina en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena”, Ayacucho 2018.**

**AUTOR: Miriam MORENO HINOJOSA**

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
¿Cuál será el polimorfismo del gen <i>CYP2C9</i> y fenotipo metabolizador de fenitoina en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho en 2018?	<p><b>GENERAL</b> Determinar el polimorfismo del gen <i>CYP2C9</i> y fenotipo metabolizador de fenitoina en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho en 2018.</p> <p><b>ESPECIFICOS</b> Identificar los alelos silvestres y/o mutantes del gen <i>CYP2C9</i> en pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena”. Establecer el genotipo y fenotipo metabolizador de fenitoina del gen <i>CYP2C9</i> en cada paciente que ingrese al estudio. Determinar las frecuencias alélicas del gen <i>CYP2C9</i>, en la población estudiada.</p>	Los pacientes con epilepsia atendidos en el Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho, presentarán polimorfismo del gen <i>CYP2C9</i> y diversos fenotipos metabolizadores de fenitoina.	Variable Principal: Polimorfismo del gen <i>CYP2C9</i> . Variable Secundaria: Fenotipos metabolizadores de fenitoina.	<p>Enfoque de investigación: Cuantitativo Tipo de Investigación: Aplicativo Diseño de investigación: Descriptivo Área de estudio: En el laboratorio de Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH. Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) del Departamento de Oncología Básico Clínico de La Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Población: La población estará constituida por todos los pacientes con epilepsia atendidos en el consultorio externo de Neurología del Hospital Regional “Miguel A. Mariscal Llerena” de Ayacucho durante el año 2018. Muestra: El tamaño de muestra será 21 pacientes con diagnóstico de epilepsia según los siguientes criterios de inclusión y exclusión. Muestreo: El tipo de muestreo por conveniencia. Técnicas e instrumentos de recolección de datos: La técnica que se utilizará es un kit para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR), con el cual se amplificó el gen <i>CYP2C9</i>, tomando como primer o cebadores sondas Taqman para la <i>CYP2C9*1</i>, <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i>. Los datos serán procesados con programa informático especializado de estadística SPSS V 23, en sus dos niveles; descriptivo y analítico.</p>