



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Detección del polimorfismo 4 de CYP2D6 en población juvenil a partir de muestras de sangre y saliva

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

LUIS GERARDO SORIANO SALAS

ASESORA: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

La presente investigación se realizó en el laboratorio del curso de Farmacogenómica de la FES Cuautitlán en campo 1 y en el Laboratorio 9 de la UIM campo 4, bajo la asesoría de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**.

Agradecemos el apoyo otorgado a través de los proyectos

PIAPIME 2016 clave 2.11.14.16 “Aprendizaje Basado en Proyecto Situados para la Enseñanza de la Genómica”

PAPIME PE206518

“FORTALECIMIENTO DE LA ENSEÑANZA DE LA FARMACOGENÓMICA EN LA FES - CUAUTITLÁN”

De igual forma agradecemos al

Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho

Del **“Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez”**, por su invaluable asesoría en el presente proyecto de investigación



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección del polimorfismo 4 de CYP2D6 en población juvenil a partir de muestras de sangre y saliva.

Que presenta el pasante: Luis Gerardo Soriano Salas

Con número de cuenta: 306297179 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Dedicatoria

A mis padres:

“El amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban mis padres por mi avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se refleja en la vida de un hijo.”

Mami y Papi no hay forma de agradecer su apoyo incondicional para poder llegar a este punto en mi vida.

Este es un poco del reflejo de su trabajo y esfuerzo que día a día hacen para poder salir adelante. Gracias por siempre estar a mi lado, por ayudarme en este proyecto con sus palabras de aliento, por no dejar de apoyarme a pesar de las adversidades.

Ustedes fueron, son y serán mi motor para seguir y lograr todas las metas que me proponga.

Infinitas Gracias a la vida y a Dios por darme unos padres ejemplares que dan todo porque sus hijos logren sus metas.

A mi hermana:

Hermana Anakaren este trabajo es dedicado a ti con la finalidad que veas que cualquier sueño y proyecto que te propongas los puedes lograr con esfuerzo, dedicación y pasión. Sin importar los obstáculos que se presenten.

Gracias por ser mi motor, por ser mi mejor amiga, por demostrarme que la vida es mejor con una sonrisa y que mejor que sonreír a tu lado.

Siempre estaré a tu lado para cuidarte y amarte con toda mi alma.

A mi tía Cecilia:

Tita gracias por ser mi segunda madre por demostrarme el lado divertido de la vida, este trabajo te lo dedico con todo mi amor como tu hijo. Sin tu apoyo no lo hubiera logrado.

A mis Abuelos:

Abuelitas: Linda, Pichita y Chole

Abuelitos: Gerardo, Pedro y Juan

Aunque físicamente no estuvieron a mi lado se, que desde el cielo guiaron cada uno de mis pasos y me apoyaron en esos momentos en los que no podía más, esto es fruto de todo su amor y las enseñanzas que me dieron.

Mis más grandes ángeles

A mis Amigos:

“Los amigos son los hermanos que la vida nos pone en nuestro camino”

Anayeli, Alejandra, Dominick, Roberto, Eduardo, Gabriela gracias por ser parte de este camino, por apoyarme durante toda la Universidad, por convertirse en mis hermanos. Esto es el inicio de una nueva etapa en mi vida la cual estoy agradecido por tenerlos en mi vida.

Gracias por cada momento de risas, pero también gracias por cada momento difícil que pasamos.

A la Dra. Sandra Díaz:

No solo mi asesora de tesis, si no mi guía durante mi carrera profesional

Dra. Sandra gracias por confiar en mí por permitirme desarrollarme profesionalmente, por enseñarme el amor y pasión que se necesitan para estar en el ámbito científico.

Gracias por darme su confianza y poder apoyarla a impartir el laboratorio de Farmacogenómica como profesor.

Por enseñarme que los fracasos no son malos al contrario son enseñanzas que nos permiten avanzar al éxito.

A mis Profesores:

A todos mis profesores, que compartieron sus conocimientos conmigo para poder lograr mis objetivos.

En especial a la Profesora Rosalba, Maritere, Llasbeth y a la Dra. Dolores por enseñarme el maravilloso mundo de las ciencias Genómicas y ayudarme durante mi proceso de profesor de Farmacogenómica.

Al Dr. Jorge Luis Guerrero del INNyNMVS

Sin su apoyo y asesoría durante toda la parte experimental no lo hubiera logrado, Gracias por cada una de sus enseñanzas.

A mis alumnos y compañeros

Gracias a todos los alumnos y compañeros que donaron sus muestras de sangre y saliva para poder lograr esta tesis.

A la Universidad:

Gracias por darme todas las herramientas necesarias para poder concluir mi Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica, es un orgullo poder decir “Soy egresado” de la Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán Campo 1.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”



ÍNDICE GENERAL

1.-INTRODUCCIÓN	1
1.1 DNA ESTRUCTURA PRINCIPAL DE VIDA	1
1.2 Estructura del DNA	1
1.3 Replicación y transcripción del material genético	2
1.4 Genoma	3
2.0 CIENCIAS ÓMICAS	5
2.1 Genómica	6
2.2 Transcriptómica	7
2.3 Proteómica	7
2.4 Epigenómica	9
2.5 Metabolómica	10
2.6 Farmacogenómica – Farmacogenética	11
2.6.1 Limitantes actuales de la Farmacogenómica	13
3.0 Variabilidad a la respuesta farmacológica	15
3.1 Polimorfismos genéticos	16
3.2 Blancos de acción de drogas	19
4.0 Citocromo P450	19
4.1 Nomenclatura de enzimas del CP450	20
4.2 Características generales de la enzima CYP2D6	20
4.2.1 Evolución del locus CYP2D6	21
4.2.2 Genética molecular del gen CYP2D6	21
4.2.3 Variantes Alélicas CYP2D6 normales	22
4.2.4 Alelos CYP2D6 asociados a metabolismo lento	22
4.2.6 CYP2D6 y el metabolismo ultrarrápido	23
5.0 Evaluación de la actividad individual del CYP2D6	24
5.1 Dosificación según fenotipo CYP2D6	25
5.1.1 Metabolizadores lentos	25
5.1.2 Metabolizadores ultrarrápidos	26
5.1.3 Metabolizadores intermedios	26
6.0 Perspectivas futuras del estudio de la variabilidad del gen CYP2D6	26
7.0 Composición de la sangre	27
7.1 Composición de la saliva	28
7.2 Extracción de DNA utilizando sangre y saliva	28
8.0 Justificación del trabajo de tesis	31

9.0 Objetivo General	31
9.1 Objetivos Particulares	31
10. Metodología	32
10.1 Toma de Muestra biológica	33
10.1.2 Extracción de sangre periférica	33
10.1.3 Recolección de saliva fresca	33
10.2 Extracción de DNA a Partir de Sangre periférica	33
10.2.1 Extracción de DNA a partir de Saliva fresca	34
10.3 Cuantificación de DNA obtenido	35
10.3.1 Análisis de integridad de DNA	35
10.4 Amplificación del Gen CYP2D6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR- Punto Final)	36
10.5 Evaluación del amplificado	37
10.6 Caracterización del polimorfismo *4 de CYP2D6 mediante restricción enzimática, utilizando la enzima <i>Micrococcus varians</i> (Mva1).	38
11.0 Resultados	40
12.0 Análisis de Resultados	52
12.1 Obtención de Muestra Biológica Primaria	52
12.1.1 Calidad, Funcionalidad, Estabilidad y Accesibilidad	53
12.2 Análisis Estadístico para resultados de muestras de sangre y saliva	57
12.2.1 Media calculada para concentraciones ng/μL. para muestras de sangre y saliva	57
12.2.2 Media calculada de la relación 260/280 para muestras de sangre y saliva	58
12.2.3 Coeficiente de Variación (CV) calculado para relación 260/280 y Concentración (ng/μL.)	59
12.2.4 Cálculo de desviaciones estándar (SD) para la relación 260/280 y concentraciones ng/μL	60
12.3 Obtención de producto de PCR	61
12.3.1 Evaluación del producto de PCR	63
12.4 Caracterización de polimorfismo mediante restricción con enzima Mva1	65
13. Conclusiones	67
14. Perspectivas del Proyecto	68
Anexo A	69
1.1 Preparación de soluciones	69
1.2 Carta de consentimiento informado	70
1.3 Ficha Técnica de Primer (Reverse)	71
1.4 Ficha Técnica de Primer (Forward)	72
1.5 Corolario	73

INDICE DE CONTENIDO

Índice de Figuras

Figura 1. Comparación en cuanto a los tamaños de genomas de diferentes especies (Garlang, 2008).	4
Figura 2 Fundamentos de Farmacogenética. Opciones de efectividad y toxicidad de un mismo fármaco en base al perfil genético de una población (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).	14
Figura 3 Polimorfismo de nucleótido simple SNP (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015)	17
Figura 4. Variabilidad metabólica en la respuesta a fármacos (Belloso & Redal, 2010).....	18
Figura 5. Componentes para reacción de PCR.....	37
Figura 6. Digestión con la enzima Mva1 del producto de la PCR para la detección del polimorfismo G1846A (Casas, Zavaleta, & H. Izaguirre, 2015).	39
Figura 7. Comparación de la integridad de DNA en gel de agarosa al 0.5 %	47
Figura 8. Producto amplificado de PCR para muestras de sangre y de saliva en gel de agarosa al 1%.	48
Figura 9 Producto de la Restricción Enzimática con Mval en gel de agarosa al 1.5%	49

Índice de Tablas

Tabla 1 Factores Intrínsecos y Extrínsecos que afectan la respuesta farmacológica (Belloso & Redal, 2010).	15
Tabla 2 Mutaciones más frecuentes detectadas en el gen CYP2D6 (Belloso & Redal, 2010).	24
Tabla 3 Componentes celulares y químicos de la sangre (Ruiz, 2012).	27
Tabla 4 Componentes para PCR	36
Tabla 5 Componentes para la restricción enzimática, por cada muestra.....	38
Tabla 6 Lecturas de los parámetros de concentración y Abs 260/280 de DNA obtenido a partir de muestras de sangre.....	40
Tabla 7. Estadística descriptiva de los parámetros del DNA obtenido de las muestras de sangre. Programa estadístico GraphPad Prism.	41
Tabla 8 Lecturas de los parámetros de concentración y Abs 260/280 de DNA obtenido a partir de muestras de saliva	43
Tabla 9 Estadística descriptiva de los parámetros del DNA obtenido de las muestras de saliva. Programa estadístico GraphPad Prism.	44
Tabla 10 Resultados de Genotipos para muestras de sangre.	50
Tabla 11 Resultados de Genotipos para muestras de saliva.....	51
Tabla 12 Fenotipo y Genotipo para CYP2D6*4 (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).	52

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Desviación Estándar de la relación 260/280 para muestras de sangre	42
Gráfico 2 Desviación Estándar de las concentraciones (ng/μL) para muestras de sangre	42
Gráfico 3 Desviación Estándar de la relación 260/280 para muestras de saliva	45
Gráfico 4 Desviación Estándar de la concentración ng/μL para muestras de saliva	45
Gráfico5 Concentración del DNA extraído (ng/μL) de muestras de sangre y saliva. La prueba de t mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestra (p<0.01).....	46
Gráfico 6 Comparación de la relación 260/280 de DNA en muestras de sangre y saliva. La prueba de t mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestra (p<0.01).....	46

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 DNA ESTRUCTURA PRINCIPAL DE VIDA

En la actualidad el estudio del DNA es de suma importancia para el área de investigación médica, ya que gracias a esta estructura se pueden comprender ciertas características patológicas o no patológicas de diferentes especies.

El DNA está compuesto por unidades o monómeros que se repiten miles de veces a lo largo de la molécula, estas unidades se llaman nucleótidos y por consiguiente, el DNA es un polímero muy grande de nucleótidos, se le denomina polinucleótido (Hart & Jones, 2010).

En realidad, el DNA está formado por dos polinucleótidos, cada uno de ellos con forma de hélice, es decir es una doble hélice. El hecho que la molécula de DNA está formada por dos hélices, resulta esencial para comprender sus funciones replicativas y además para comprender sus propiedades básicas, la “desnaturalización” y la “renaturalización”.

Cada nucleótido es un compuesto orgánico formado a su vez por tres componentes. Un radical del ácido fosfórico, un azúcar y una base nitrogenada. Para el DNA, el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas usualmente son solo cuatro: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). Las dos primeras bases, que son mayores y están formadas por dos anillos heterocíclicos, se llaman bases púricas o purinas; mientras que las dos últimas, más pequeñas son llamadas bases pirimídicas o pirimidinas. Estas bases nitrogenadas absorben intensamente la luz ultravioleta corta en la longitud de 259nm, debido a su estructura en anillo con uniones covalentes dobles que poseen resonancia (Solari, 2013).

1.2 Estructura del DNA

En la actualidad un gen se define como un segmento completo de DNA cromosómico capaz de generar un producto funcional.

La molécula de DNA tiene la misma estructura polinucleotídica general en todos los seres vivos.

El DNA está conformada de una doble hélice las cuales son complementarias una a la otra. Las bases nitrogenadas ya antes mencionadas (A, G, C, T) están una después de la otra, y siempre separadas a la misma distancia (33.44 Å) (Hart & Jones, 2010).

Un hecho importante es que las bases son complementarias entre sí, es decir que una T siempre tendrá una A en la hélice de enfrente y siempre frente a una G habrá una C, y así sucesivamente. Esta característica es la que permite replicar y hacer copias del material genético.

Sin embargo, existe el Uracilo(U), el cual está presente en otra molécula de ácido nucleico, el ácido ribonucleico o RNA mensajero, que también existe en algunos virus, pero en el DNA solo existen estas cuatro bases ya antes mencionadas (Soberon & Bolivar, 2009).

1.3 Replicación y transcripción del material **genético**

La replicación del material genético es el mecanismo mediante el cual una molécula de DNA puede dar lugar a dos moléculas idénticas a partir de ella misma. Muchos biólogos sustentan que este mecanismo constituye, desde el punto de vista molecular, el proceso mismo de la vida.

La célula tiene la capacidad de separar la molécula de DNA en dos hebras complementarias durante el proceso de copiado. Para ello utiliza como molde una de las hebras y sintetiza la hebra complementaria, de esta manera tenemos dos hebras dobles, así se forman dos moléculas idénticas a partir de una molécula original. Este es el fenómeno fundamental en que se sustenta la capacidad que tienen los seres vivos para poder duplicar y replicar su material genético y pasarlo a células hijas durante el proceso de formación de nuevas generaciones (Soberon & Bolivar, 2009).

Otra función muy importante del DNA es su participación en la síntesis de proteínas. En nuestro DNA hay aprox. 30 mil genes codificantes, los cuales son segmentos diferentes, unos de otros. El proceso para sintetizar una proteína a partir del DNA es un mecanismo celular que implica copiar el gen particular en una copia que se le da el nombre de RNA, como se mencionó anteriormente este en esencia es muy parecido al DNA, con excepción de que en lugar de una T tiene U; posteriormente este ácido nucleico se traduce en una proteína (Hart & Jones, 2010).

La célula abre o separa las hebras en un segmento específico del DNA. A partir de este proceso de síntesis la célula realiza una copia de RNA mensajero (RNAm), y a partir de la copia, donde debería de ir una timina aparece un uracilo. Esta nueva molécula, que puede ser de gran tamaño se llama RNA mensajero (RNAm). Esta se exporta del núcleo de la célula al citoplasma donde se localizan los ribosomas y se traduce en la síntesis de proteínas (Koolman, 2009).

El código para sintetizar las proteínas se da a partir de aminoácidos que forman polímeros. En la célula hay veinte diferentes aminoácidos, y es a partir de la unión y combinación de estos, como se sintetizan las diferentes proteínas. Cada proteína tiene una secuencia diferente de aminoácidos y tiene la propiedad, dependiendo de dicha secuencia, de asociarse sobre sí misma y eventualmente adquirir una estructura terciaria o la posibilidad de asociarse con otras proteínas y adquirir una estructura cuaternaria. De hecho, estas asociaciones permiten definir las funciones de cada una de las proteínas (Solari, 2013).

A partir de la secuencia de las bases del DNA se copia el RNAm; la manera en que la célula lee en los ribosomas esta secuencia es a partir de una secuencia de tres en tres. Estas secuencias triples se llaman codones los cuales son responsables de la secuencia lineal de los aminoácidos de las proteínas; la secuencia de los codones de tres en tres esta así directamente relacionada con la secuencia de las cuatro bases que hay en el DNA.

Cada gen es responsable de una proteína específica con una actividad específica; la secuencia de los aminoácidos en la proteína se correlaciona en forma directa y lineal con la secuencia de las bases en el DNA. Esta es la manera en que la célula convierte la información genética en proteínas, las cuales constituyen las herramientas vitales para la realización de las funciones del organismo (Soberon & Bolivar, 2009).

1.4 Genoma

El genoma es el conjunto de todos los genes que define en forma completa la naturaleza de un organismo ya sean regiones codificantes o no. Para los humanos, estos 80 mil genes los tenemos organizados en los 46 cromosomas, que se encuentran en el núcleo de las células. Este patrimonio completo de información genética es lo que denominamos genoma (Hart & Jones, 2010).

El genoma humano tiene aproximadamente 3 mil millones de pares de bases (3×10^9 pares de bases). El de ratón más o menos la misma cantidad; la mosca tiene como una vigésima parte, el gusano un poco menos que la mosca; una bacteria tiene el orden de mil veces menos que el genoma humano.

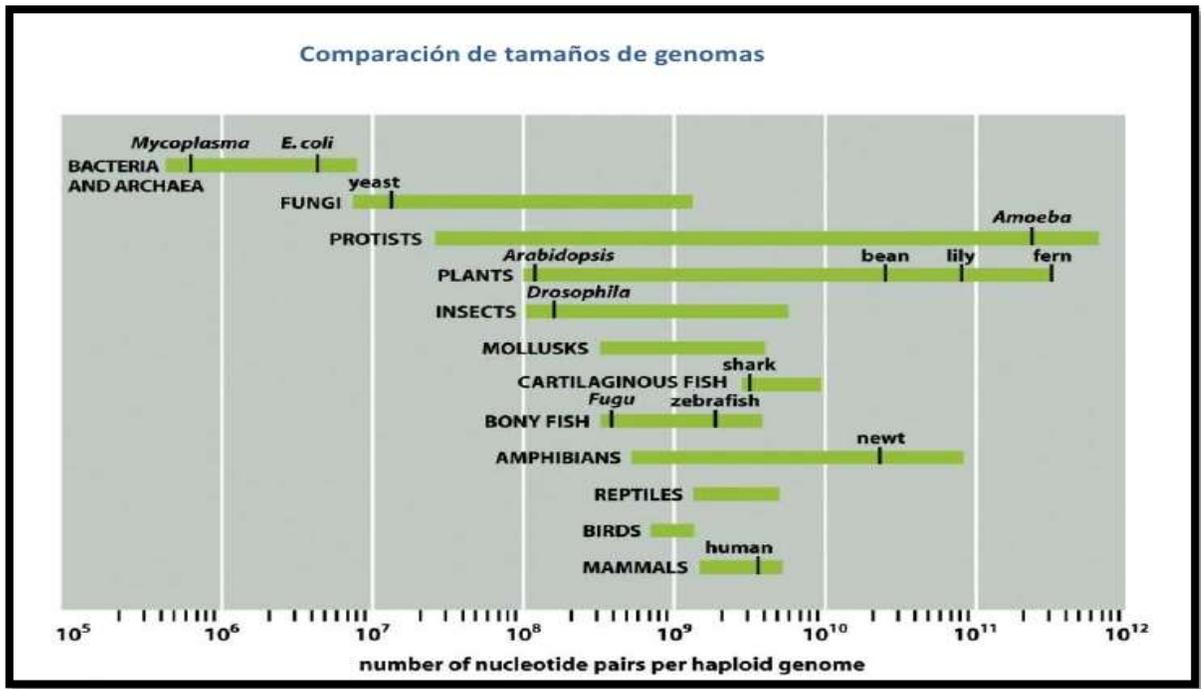


Figura 1. Comparación en cuanto a los tamaños de genomas de diferentes especies (Garlang, 2008).

Sin embargo, compartimos una gran cantidad de material genético con los diferentes organismos (**Figura 1**) como por ejemplo con el ratón compartimos más o menos el 95%; lo cual implica que una importante proporción de los genes presentes en la mosca, están presentes en nosotros y viceversa. Con el chimpancé, compartimos 99% de nuestros genes, y es la especie más cercana a nosotros en la evolución continua a través de la escala filogenética. (Pierce, 2003)

En el siglo XXI se concluyó el análisis del “Genoma Humano”; para poder entender cuál fue el objetivo de analizar y determinar el mapa genómico del humano, es necesario hablar acerca de que son las mutaciones en el genoma.

Una mutación es el cambio de la secuencia original en el DNA. Una mutación por sustitución ocurre simplemente cuando un par de bases cambian por ejemplo, un par AT se convierte en un par CG o GC con lo cual la secuencia cambia. Dependiendo del tipo de mutación, será el cambio. La mutación también puede ser por adición, si en la secuencia normal entran un par de bases más que originalmente no estaban; y por delección en la cual se suprime uno o varios pares de bases con relación al original. En las adiciones pueden sumarse más de un par de bases. En algunos casos estas mutaciones tienen como consecuencia que el gen ya no codifique adecuadamente para la proteína y esta no sea funcional (Soberon & Bolivar, 2009).

Con el estudio de estas mutaciones se ha logrado determinar la gran mayoría de patologías que pueden llegar a afectar al ser humano y de esta forma investigar y buscar algún tratamiento o solución al padecimiento.

En la actualidad la biología molecular está dando lugar a un nuevo periodo en la concepción de genes y los genomas que algunos autores lo denominan como “la era de los genomas completos”, cuyo estudio se denomina ciencia genómica (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

2.0 CIENCIAS ÓMICAS

En el año 1986 se abrió camino hacia el futuro ya que, gracias a todos los conocimientos y descubrimientos del ADN, se logró emprender un nuevo proyecto “el proyecto genoma humano”. El genoma fue secuenciado en sus 3,200 millones de nucleótidos gracias a un esfuerzo internacional liderado por la Organización de Genoma Humano.

El primer borrador de este proyecto fue publicado en el 2001, pero el punto culminante de esta aventura se alcanzó cuando en el año 2003 se publicaron los resultados de tal proyecto.

La información que, a partir de entonces, se ha podido obtener es de gran magnitud y se incrementa teniendo en cuenta que para llegar a reconocer donde comienza y terminan los genes e identificar sus exones, intrones y secuencias reguladoras se requiere de comparaciones entre secuencias de diversas especies. El mapa de secuencias que se generó por este proyecto se está utilizando como fuente primaria de información para la biología humana y la medicina (Hidalgo Pérez, 2015).

Con esta información se dio pie a la creación de una nueva rama, la Bioinformática o también conocida como Bio-computación. Con esto la Organización del Genoma Humano logró crear bases de datos de acceso libre donde se pueden encontrar las secuencias de casi todas las especies biológicas, en el caso de los humanos podemos encontrar las secuencias codificantes y no codificantes para poder hacer uso de las mismas y arrancar con nuevos proyectos con los cuales se logren avances en la Biomedicina (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015)

Sin embargo, a partir del Proyecto Genoma Humano no solo se abrió esta rama de las ciencias; si no de igual forma se conocieron las Ciencias Ómicas.

Las principales ciencias Ómicas desarrolladas durante los últimos años son la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, sin embargo, cada una de ellas se ha ramificado a medida que se van obteniendo un mayor número de datos. Todas ellas aportan grandes avances en el conocimiento básico de los temas biológicos, además de traer consigo un enorme desarrollo en el campo del análisis de la funcionalidad celular y en sus aplicaciones biotecnológicas (Hart & Jones, 2010).

2.1 Genómica

La genómica es el campo de la genética que persigue como objetivo el comprender el contenido de la organización, función y la evolución de la información molecular del DNA contenida en el genoma completo.

En el desarrollo de la misma existe una era pre-genómica, en la cual se “espiaban” a los genes, estudiando uno por uno su localización cromosómica, su función y su asociación con patologías específicas. Y una era post-genómica en la cual se analizan los cambios que se generan a diversos niveles bajo diferentes condiciones y circunstancias en el genoma completo.

La genómica se divide en dos ramas principales. La genómica estructural orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el DNA, permitiendo de esta manera la obtención de mapas genéticos de los organismos. Por otro lado, la genómica funcional se orienta hacia la recolección sistemática de información acerca de las funciones desempeñadas por los genes. Esta última, emplea técnicas de análisis masivo para el estudio de genes, proteínas y metabolitos. Ambas ramas permiten ir más allá de la simple descripción de un solo gen, ya que permiten conocer las variaciones del genoma a distintos niveles: expresión de ARN's mensajeros, función de proteínas, producción de metabolitos e incluso las interacciones físicas que cada uno de estos componentes celulares establecen para formar las redes que componen un sistema biológico. (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015) (Vargas Parada & Juan Pedro, 2010)

En términos generales, la genómica trata de explicar el origen de un fenotipo determinado a partir de los cambios generados en cualquiera de los niveles moleculares antes mencionados. Dado a la complejidad del DNA no solo la genómica se puede dividir en dos ramas, si no que se tienen más ramificaciones de esta como, por ejemplo:

1. **Orfeómica:** estudio de la información de los marcos abiertos de lectura de las unidades de transcripción.
2. **Promoterómica:** estudia los promotores de los marcos abiertos de lectura.
3. **Metilómica:** modificaciones Epigenéticas como metilaciones.
4. **Transcriptómica:** estudio de los RNA's , principalmente estudia el RNA'm.
5. **Haplómica:** estudio de casos especiales de los gametos.
6. **Fenotipómica:** estudio de la manifestación de fenotipos.
7. **Epigenómica:** estudio de factores epigenéticos capaces de alterar la expresión de genes sin cambiar la secuencia de ADN, como la metilación de las citosinas y la acetilación, o fosforilación de histonas.

Actualmente la genómica forma parte integral de las ciencias biomédicas de tal manera que ha comenzado a modificar la práctica médica con el establecimiento de mejores métodos de diagnóstico y pronóstico. Gracias al avance de la tecnología día con día estas ciencias Ómicas se han desarrollado rápidamente generando nuevas

ramas de estas. A continuación, se hablará de las ciencias Ómicas más utilizadas y estudiadas en el ámbito genómico y de investigación (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015). (Gaona Figueroa, 2014)

2.2 Transcriptómica

La Transcriptómica es el estudio del conjunto de RNA que existe en una célula, tejido u órgano. Como los proteomas, los transcriptomas son muy variables, ya que muestran que genes se están expresando en un momento dado.

Principalmente en la actualidad esta ciencia es utilizada para estudiar los transcriptomas de las células cancerosas y de las células madre ya que pueden ayudar a entender los complicados procesos de carcinogénesis y de desarrollo y diferenciación celular. Consiste en analizar los miles de moléculas de RNA de todo tipo, es decir, el transcriptoma, mediante diferentes técnicas dentro de las cuales la más usada son los microarreglos (microarray) de DNA. La idea básica de esta técnica es construir, sobre una membrana o lámina de vidrio partes de muestras que contienen fragmentos de DNA. Por otro lado, se marca el RNA o el DNA copia de una población celular con fluorescencia o radioactividad y se hibrida simultáneamente el mismo micro matriz con una muestra de RNA o DNA copia de referencia, para facilitar la comparación (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

2.3 Proteómica

La Proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como analogía con genómica, el estudio de los genes. La palabra “proteoma” es la fusión entre “proteína” y “genoma” y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994 (Hidalgo Pérez, 2015).

Las modificaciones Post - traduccionales afectan tanto en la forma como en la función de una proteína. Mientras el genoma es prácticamente invariable, él proteoma no solo difiere de una célula en otra célula, sino que también cambia según las interacciones bioquímicas con el genoma y el ambiente. El proteoma varía de un tipo de célula a otra, de un año a otro, de un momento a otro. Inclusive las proteínas son más diversas que los genes que las determinan, ya que un solo gen puede codificar diferentes versiones de una proteína, que incluso pueden tener una función diferente.

La proteómica es una ciencia relativamente reciente al igual que la mayoría de las llamadas ciencias ÓMICAS. Una de la técnicas responsables del despegue de esta nueva rama de las ciencias genómicas ha sido la consolidación definitiva de la espectrofotometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y /o proteínas en las bases de datos , esto aunado con el empleo de potentes métodos de fraccionamiento y separación de

péptidos y proteínas como la electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones y la cromatografía líquida de alta resolución, estas técnicas han permitido consolidar la proteómica, desde mediados de los años 90 del siglo pasado, como ciencia para el análisis masivo de proteínas (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

Como en cualquier rama científica y más hablando de las áreas genómicas, existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo.

- La proteómica de expresión se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones post transcripcionales.
- La proteómica estructural se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas
- La proteómica funcional se encarga de la localización y distribución subcelular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función.

Las aplicaciones de la proteómica son múltiples, pero actualmente se destacan las siguientes:

- Identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades
- Identificación de nuevos fármacos y blancos terapéuticos
- Determinación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de enfermedades
- Análisis de rutas de transducción de señales (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015)

El estudio y comparación sistemática del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso concreto del análisis proteómico asociado a patologías concretas, permite que se puedan identificar proteínas útiles para diagnosticar las enfermedades o pronosticar la evolución de estas. Dichas proteínas son mejor conocidas como biomarcadores y en la actualidad se estudian diferentes biomarcadores para diferentes tipos de patologías en el ser humano (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

Para destacar la importancia de esta ciencia genómica y del descubrimiento de biomarcadores a continuación se mencionarán unos de los más destacados y con más relevancia para el diagnóstico y tratamiento de las diferentes patologías asociadas a proteínas.

1. Antígeno CA15-3 (para el cáncer de mama)
2. La α -fetoproteína L3 (AFP L3),
3. Carboxiprotrombina (carcinoma hepatocelular)
4. Antígeno prostático (PSA)
5. La beta-secretasa (enfermedad de Alzheimer)

6. Huntingtina (enfermedad de Huntington)

Y así como los mencionados anteriormente cada día existen nuevas investigaciones y descubrimientos en cuanto a la proteómica lo cual permite un gran avance en las ciencias genómicas (Hart & Jones, 2010)

2.4 Epigenómica

El estudio del epigenoma humano, que viene a ser la conexión entre los factores del ambiente y la expresión de nuestros genes, ha cobrado gran relevancia en la ciencia después de que hace más de una década se empezara la elaboración del mapa del genoma humano. La Epigenómica permite identificar secuencias del genoma importantes para la regulación de la expresión de los genes, que quedan ocultas. Para varias enfermedades se han encontrado factores de riesgo que denotan mayor o menor grado de probabilidad en el desarrollo de ellas, sin ser determinantes de su aparición. Además de su genoma cada célula tiene un epigenoma, el cual es definido por el perfil de expresión génica en respuesta a estímulos ambientales y mecanismos regulatorios a nivel molecular. El término epigenética fue introducido, por Conrad Waddington a principios de 1940, definiéndola como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo” (Gonzalez, Cristiano, & Arbigay, 2014).

En la actualidad, se puede definir a la epigenética como aquellos cambios estables y heredables en la expresión génica, que no son atribuidos a alteraciones en las secuencias de DNA. Estos cambios pueden afectar tanto la expresión de los genes como las propiedades de sus productos finales. Para poder comprender mejor este concepto podemos decir que la regulación de la expresión génica tiene dos componentes principales. El primero está determinado por el control inmediato que ejercen activadores y represores de la transcripción sobre los genes. El segundo componente encargado de regular la expresión génica está determinado por los controles epigenéticos que se ejercen sobre la expresión de la misma. Los mecanismos epigenéticos que actúan regulando la transcripción incluyen principalmente:

- La metilación del DNA
- Cambios en la configuración de la cromatina
- La impronta génica
- El silenciamiento de los genes por unión de RNA

En conjunto estos cuatro mecanismos epigenéticos junto con el control ejercido por activadores y represores tienen la capacidad de regular que genes se expresarán y en qué momento de la vida de la célula.

Puesto que los cambios epigenéticos son dependientes de factores internos y externos, se pone de manifiesto la compleja red de interacciones que generan la gran plasticidad del genoma para ejecutar el programa

genético dependiendo de las modificaciones epigenéticas que son únicas y específicas de la diferenciación celular. La gran mayoría de las enfermedades hereditarias son de naturaleza multifactorial, lo que impone un nuevo marco de estudio para definir no solamente los genes involucrados sino sus relaciones y modificaciones epigenéticas (Hart & Jones, 2010)

2.5 Metabolómica

La Metabolómica cataloga y cuantifica a las moléculas pequeñas que encuentran en los sistemas biológicos. Es una nueva rama en bioquímica analítica que está relacionada con el metabolismo. El proceso de conversión de energía de alimentos en energía mecánica o calor. Los subproductos del metabolismo conocido como metabolitos se encuentran en muestras biológicas tales como orina, saliva y plasma sanguíneo. En el caso de la biología vegetal, muestras de tejido específico se utilizan para perfilar metabolitos.

La Metabolómica creció junto con la genómica y la proteómica desde mediados de los años noventa como resultado del proyecto del genoma humano.

El metaboloma es una colección de todos los metabolitos en una célula en un momento determinado en el tiempo. Los seres humanos tienen muchos tipos de células con metaboloma diferentes y la Metabolómica se ocupa del estudio de los metabolitos con bajo peso molecular como lípidos, azúcares, aminoácidos y vitaminas (Hart & Jones, 2010).

Enfermedades genéticas y enfermedades o trastornos ambientales pueden explicarse por el estudio de los cambios en el metaboloma. Por lo tanto, el estudio de los metabolitos, a saber, la Metabolómica, puede ayudar a diagnosticar enfermedades o estudiar los efectos de una sustancia o de una intoxicación.

Existen dos enfoques complementarios que se utilizan para las investigaciones Metabolómicas. Uno de los enfoques es el diseño de perfiles metabólicos y metabolitos de rasgo digital. En la generación de perfiles metabólicos, los métodos de análisis cuantitativos se utilizan para medir metabolitos de una clase determinada. En la huella metabólica, las huellas se comparan para determinar si los metabolitos han cambiado debido a la enfermedad o la exposición a las toxinas. Para hacer este tipo de comparación podrían utilizarse cromatogramas y métodos estadísticos. Es un método semicuantitativo que realmente puede aplicarse a una amplia gama de metabolitos. Este nuevo enfoque para el estudio del perfil metabólico no se hubiese podido producir sin los últimos avances tecnológicos, tanto de la resonancia magnética nuclear como de la espectrofotometría de masas. No obstante, a su vez, dichos avances no hubieran sido suficientes sin la evolución en paralelo de las herramientas informáticas y del tratamiento estadístico necesario (Pierce, 2003).

En un futuro se espera y se tiene la esperanza de que esta nueva rama de las ciencias Ómicas, pueda ayudar al cuidado de la salud de muchas maneras. Debe ser capaz de producir medicamentos más seguros y mejorar la

identificación de grupos de personas que puedan beneficiarse de un medicamento. También puede contribuir a diagnosticar enfermedades y controlar diversos tratamientos para la salud.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente cada una de estas ciencias Ómicas son de mayor impacto cuando se fusionan y se ocupan más de dos a la par. La metabolómica integrada con la proteómica y genómica se utiliza, por ejemplo, para investigar la razón por la cual ciertas personas son más susceptibles a daño hepático por parte de ciertos fármacos. Se espera que el campo desempeñe un papel importante en la biología de sistemas a largo plazo y corto plazo, para que proporcione biomarcadores para estudiar la exposición a enfermedades y toxinas (Soberon & Bolivar, 2009).

Como parte de la genómica funcional, la metabolómica puede ser una herramienta para estudiar la función de los genes, a través de la mutación por delección o inserción de nucleótidos. En la nutrigenómica, que relaciona las Ómicas con la nutrición humana, la metabolómica podría servir para correlacionar los perfiles de metabolitos de fluidos y órganos con patologías, constitución genética y dietas. En lo que respecta a seguridad alimentaria de nuevos cultivos transgénicos, la genómica, proteómica y metabolómica constituyen las principales herramientas usadas por los expertos en todo el mundo en bioseguridad y análisis de riesgo para concluir sobre la inocuidad alimentaria de estos nuevos cultivos y sus derivados.

Donde también puede ser útil la metabolómica es en la medicina personalizada. Actualmente, cuando se selecciona un tratamiento para una persona enferma se conoce muy poco sobre su fenotipo metabolizador y sobre las probables reacciones frente al tratamiento elegido. El conocimiento de las variables metabólicas debería servir para predecir la reacción de un ser vivo a la administración de los medicamentos. De tal manera que el tratamiento podría particularizarse para cada individuo, eligiendo el mejor principio activo y la dosis más efectiva para cada uno (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

Otro ámbito de importancia dentro de la investigación de la metabolómica es aquel en la detección de factores de riesgo en poblaciones. A partir de un análisis de orina o suero, sería realmente extraordinario poder conocer para un individuo determinado, que factores de riesgo presenta, a qué tipo de enfermedades está predispuesto, y una estimación sobre la probabilidad de desarrollarlas. De hecho, está resultando muy útil para estudios de obesidad e incluso ha surgido nuevas aproximaciones “Ómicas” para separar los distintos tipos de metabolitos relacionados con esta enfermedad; lipodómica (estudio de lípidos y ácidos grasos); glucómica (estudio de carbohidratos) y otros (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

2.6 Farmacogenómica – Farmacogenética

Para entender que es la farmacogenómica es necesario referirnos antes a la farmacogenética. Curiosamente, nos podemos remontar al año 510 a.C. cuando Pitágoras observó que la ingesta de habas producía en algunos individuos una reacción potencialmente fatal. Con el tiempo se descubrió que la causa radicaba en la deficiencia

de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que producía anemia hemolítica. Esta se podría considerar la primera observación escrita relacionada con la Farmacogenética. No obstante, hasta 1930 fue publicado el primer informe sobre farmacogenética moderna, en ese caso se trataba de la incapacidad de algunos individuos para saborear la feniltiourea o feniltiocarbamida (Evans W. , 2013).

En 1957 Motulsky fue quien primero documentó el concepto de que los defectos heredados en el metabolismo de fármacos podían explicar las diferencias individuales en la respuesta a medicamentos y posteriormente Friedrich Vogel en 1959 acuñó el término de Farmacogenética definiéndolo como “ *el estudio de la influencia de los genes de un individuo en la respuesta a los fármacos*” o dicho de otra manera , el estudio del papel de la herencia en la variación interindividual de la respuesta farmacológica , tanto en lo que se refiere a eficacia en la respuesta como a efectos adversos (Stratchan & Read, 1999).

El campo de la Farmacogenética fue estimulado en los años 70’s con hechos como la descripción que Robert Smith hizo en 1977 de la deficiencia en el metabolismo de la debrisoquina, cuando personalmente experimentó una importante hipotensión ortostática tras tomar el medicamento. Ahora se sabe que el defecto correspondiente es debido a la alteración de la enzima citocromo P450 2D6 (CYP2D6).

Actualmente, el objetivo de la Farmacogenética es “*optimizar el tratamiento de enfermedades a nivel individual*” es por tanto una de las prioridades de la medicina personalizada.

Posteriormente, en 1998 apareció el término de Farmacogenómica la cual estudia “*el total de genes farmacológicamente relevantes, sus variaciones y como pueden interaccionar para configurar el fenotipo de respuesta a los fármacos en cada individuo*” (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

Esta rama de las ciencias Ómicas tiene 3 principales objetivos los cuales son mejor conocidos como la Triada de la Farmacogenómica: (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015)

1. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas

La búsqueda de nuevas dianas o blancos terapéuticos permitirá el estudio completo del metabolismo de los fármacos, así como permitirá la búsqueda de sitios de acción más completos y rápidos para el paciente.

2. Estudiar la relación entre el genoma y el metabolismo de fármacos

La relación entre en el genoma y el metabolismo de fármacos es de suma importancia puesto que como ya se mencionó existen diferentes variaciones génicas que pueden llegar a afectar la efectividad de un tratamiento farmacológico.

Por lo tanto, el estudio de estas variaciones en diferentes grupos de estudio nos permitirá llegar a una medicina personalizada dependiendo del genoma de cada uno de los pacientes.

3. Buscar una medicina farmacológicamente personalizada

La medicina personalizada es una meta que se ha buscado desde el inicio de la era genómica, con la aparición de ciertas variaciones génicas se ha logrado predecir el metabolismo de fármacos dependiendo de cada uno de los individuos.

La búsqueda del impacto en las variaciones del genoma humano en la respuesta a los medicamentos se ha extendido en los últimos años gracias a la culminación del Proyecto Genoma Humano y más recientemente del proyecto Hap Map Internacional, el cual define patrones de asociación entre diferentes variantes génicas y permite seleccionar un mínimo de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que capturen la máxima diversidad del genoma humano; el uso de tales SNPs evita tener que genotipificar todos los alelos.

Actualmente los SNPs suponen alrededor del 90 % de la variación genética y ya son alrededor de cuatro millones los que están registrados en las bases de datos, las cuales se actualizan de manera constante y a las que se puede tener acceso libremente (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

2.6.1 Limitantes actuales de la Farmacogenómica

La razón por la cual la investigación dentro de la farmacogenómica se basa en la búsqueda de SNPs, se encuentra principalmente en la utilidad práctica de los mismos. Ya que se ha demostrado con algunos medicamentos que es necesario realizar el análisis del genotipo de los pacientes, en ciertas patologías, antes de administrarles el tratamiento. El verdadero problema se presenta en la práctica clínica, la causa radica en varios puntos difíciles de superar en la actualidad, entre ellos la relación costo-beneficio, las repercusiones que puede tener desde el punto de vista ético el conocimiento del genoma de cada individuo, el desconocimiento de la trascendencia que puede tener la aplicación de la farmacogenómica a la hora de diseñar y realizar los ensayos clínicos sobre medicamentos, la falta de información que tanto el personal sanitario como los pacientes tiene aún sobre la farmacogenómica y por último, la efectividad de la tecnología o validación de los marcadores genéticos que permiten adaptar la intervención terapéutica de forma individualizada en cada paciente. Estos son algunos de los problemas con los cual se enfrenta la Farmacogenómica a la hora de trasladarse a la práctica clínica (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

Es sabido que no todos los individuos responden igual ante la ingesta de determinados alimentos y /o medicamentos (figura 2). Estas diferencias están basadas tanto en las enzimas metabólicas, como en las

proteínas de transporte, así como en moléculas mediadoras que se producen desde que el gen codifica una molécula o proteína hasta que esta se manifiesta como expresión de esa orden codificadora.

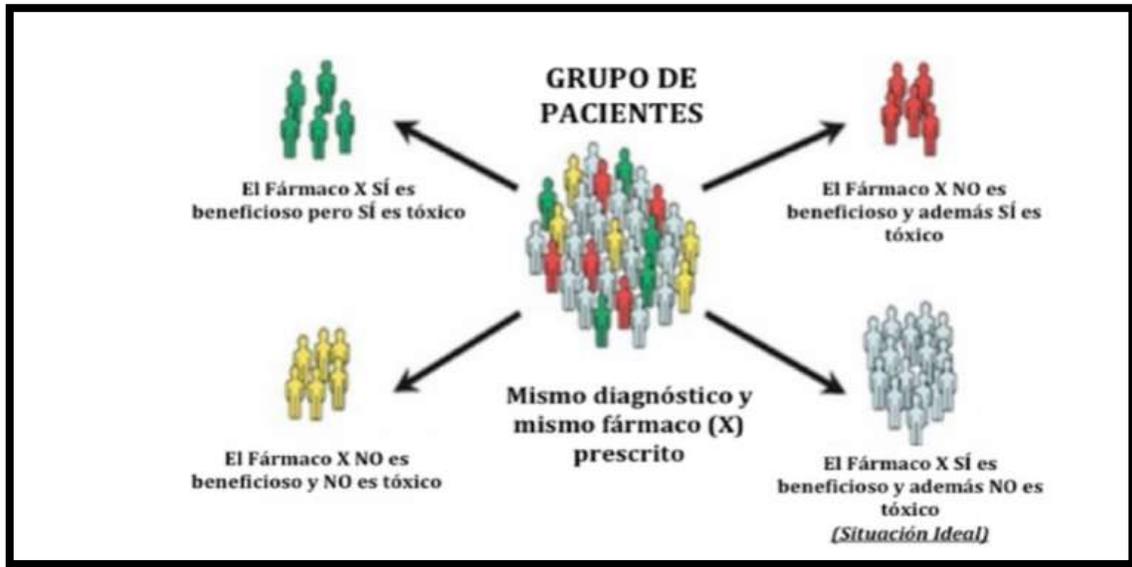


Figura 2 Fundamentos de Farmacogenética. Opciones de efectividad y toxicidad de un mismo fármaco en base al perfil genético de una población (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015).

Estas diferencias son las causantes de que el tratamiento en los pacientes no siempre sea eficaz, o bien pueda dar lugar a reacciones adversas (responsables de más de un 6 a 7 % de las hospitalizaciones) u otras veces se estima que en el 50% de los casos el efecto terapéutico no se produzca, conduciendo a lo que se denomina fracaso terapéutico. De hecho, se han retirado del mercado aproximadamente un 4 % de los nuevos medicamentos debido a reacciones adversas.

Una reacción adversa (RAM), es cualquier respuesta a un medicamento que se nociva y no intencionada y que se presenten en dosis que se apliquen normalmente en el ser humano para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades (Belloso & Redal, 2010).

La clasificación de las RAM se basa en diversos modos según el punto de vista desde el que se enfoque el problema. Las clasificaciones más usadas son:

- ✓ Tipo A o Farmacológica
- ✓ Mecanismo de Producción
- ✓ Tipo B o Idiosincrática
- ✓ Tipo C o efectos a largo plazo
- ✓ Tipo D o efectos de latencia larga
- ✓ Según la incidencia

- ✓ Según la gravedad

3.0 Variabilidad a la respuesta farmacológica

Existe habitualmente una variabilidad poblacional de la respuesta, tanto en la eficacia como en la aparición de efectos secundarios o colaterales, reconocida para la gran mayoría de los fármacos. Esta variabilidad se acepta, en general como parte del proceso del uso de medicamentos, aunque sus consecuencias pueden ser en ocasiones peligrosas.

La primera fuente de variabilidad en el largo camino entra la prescripción y el efecto farmacológico es la selección apropiada del medicamento. De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud, la prescripción apropiada implica no solamente la adecuada selección del fármaco si no también la vía de administración, la dosis y la duración del tratamiento. En segundo lugar, existen una serie de aspectos formales que no tiene que ver con la variabilidad de la respuesta farmacológica en si misma, pero si contribuye en gran medida a la variedad de resultados. La farmacología reporta variantes extrínsecas e intrínsecas (**Tabla 1**) las cuales pueden variar la respuesta farmacológica de un paciente (Belloso & Redal, 2010)

Tabla 1 Factores Intrínsecos y Extrínsecos que afectan la respuesta farmacológica (Belloso & Redal, 2010).

Intrínsecos	Extrínsecos
Edad	Disponibilidad del fármaco
Etnia	Factores ambientales
Sexo	Reglamentaciones
Disfunción orgánica	Prescripción médica
Enfermedades	Tabaquismo
Embarazo/lactancia	Uso de alcohol
Genéticos	Interacciones farmacológicas
Otros	Otros

Desde hace aproximadamente un siglo se conocen ejemplos de variabilidad genética de expresión de enzimas que pueden condicionar la acción o la toxicidad de un fármaco. El déficit de G6PD asociado al cromosoma X y su relación con la toxicidad hematológica de la primaquina, y la existencia de “acetiladores rápidos y lentos” en relación a la actividad de la N- acetiltransferasa 2(NAT-2) para la isoniacida, pueden ser considerados como los precursores del estudio farmacogenético. Sin embargo, la expansión de este tipo de análisis, en la práctica

se vio rápidamente limitada debido a que en la mayoría de los fármacos no existe una sola fuente de variabilidad intrínseca y por ello el impacto de la variación genética de una sola enzima sobre la amplitud del efecto.

La identificación de la variabilidad genética con potencial impacto sobre todos los pasos secuenciales en el camino farmacocinético- farmacodinámico de una droga es una tarea compleja que requiere en general un trabajo coordinado de colaboración, en la búsqueda de la prescripción adecuada a las características particulares de cada individuo (Belloso & Redal, 2010).

3.1 Polimorfismos genéticos

La base genética de la variabilidad en la respuesta a los fármacos se apoya en el polimorfismo genético, definido como la variación en la secuencia del DNA que se encuentra en más del 1 % de los individuos de una población, y que puede dar lugar a un carácter distinto en esa población.

La variabilidad de la expresión de los transportadores, las enzimas metabolizadoras o los receptores, es multifactorial pero depende principalmente como ya se refirió de factores genéticos. Entre estos factores hereditarios existen distintos tipos de variantes genéticas posibles, tales como deleciones, inserciones o multiplicaciones que pueden involucrar porciones relativamente extensas del DNA celular. Como ya menciono dicha variabilidad genética puede ser de distintos tipos:

- Simple sustitución de una base, donde un solo nucleótido (A, C, G, o T) es reemplazado por otro. SNP's **(Figura 3)**
- Inserción o deleción de una base en el DNA o de un conjunto de bases, en número de cientos a miles. (deletion/ insertion polymorphism) (DIPs)
- Inserción o deleción, repetidas veces de una o más bases, constituyendo los denominados microsatélites (Short Tandem Repeats) (STRs) (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015)

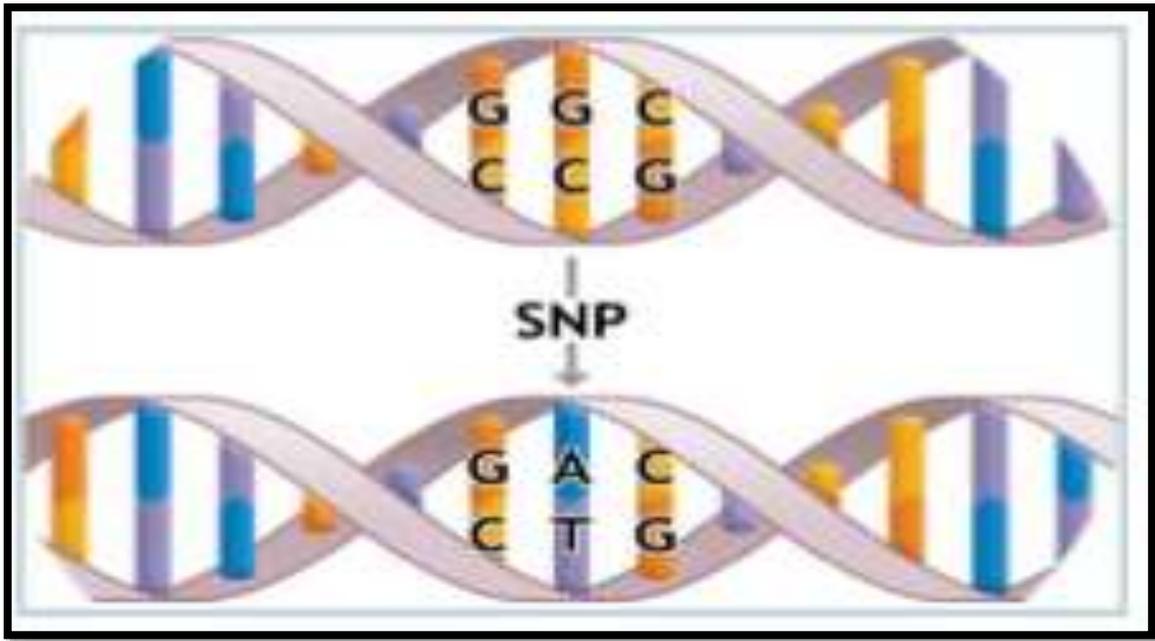


Figura 3 Polimorfismo de nucleótido simple SNP (Ruiz Bernal & Herrero Alcalde, 2015)

Dentro de estas variabilidades genéticas las más frecuentes y blanco habitual de los análisis farmacogenéticos son los SNP's. La secuenciación del genoma humano ha permitido establecer que existen más de 10 millones de SNP's, sitios específicos en los que existe un cambio de la secuencia de nucleótidos, entre los cuales solo una ínfima minoría parece tener algún tipo de impacto en la cinética o la dinámica de las drogas. De esta forma las etapas del estudio farmacogenómico pueden ir desde el aspecto puramente genético hacia la identificación de aquellos SNPs con impacto clínico, o bien en sentido inverso estableciendo las secuencias específicas de nucleótidos a partir del reconocimiento de individuos con comportamientos particulares en relación con el metabolismo de fármacos. Los genes que codifican las proteínas metabolizadoras, transportadores o receptores pueden presentar distintas variantes alélicas, algunas de las cuales demuestran un impacto concreto sobre la magnitud de la expresión de sus productos (Dooley & Hogan, 2003).

Se considera que un gen es polimórfico cuando presenta variaciones en su secuencia y estas variantes tienen una frecuencia mayor a 1 % en la población. En general estas variantes se encuentran asociadas a una expresión deficitaria o en la minoría de los casos una sobreexpresión de la enzima, transportador o receptor correspondiente (Hart & Jones, 2010).

En estos casos, el estudio de los polimorfismos permitiría predecir el comportamiento particular del proceso farmacológico involucrado caracterizando al individuo. Esto debido a que esta variación puede modificar la diana o receptor farmacológico del medicamento, es decir tanto nivel farmacocinético como farmacodinámico. En casi todos los genes que codifican estas enzimas y proteínas se han observado polimorfismos genéticos que han permitido clasificar la población en función de su actividad metabólica.

- Con actividad normal o rápida (extensive metabolizer , EM) , metabolizadores rápidos 75-85 % de la población
- Con actividad intermedia (intermediate mebolizer, IM), metabolizadores intermedios 10-20 % de la población.
- Con actividad lenta (poor metabolizer, PM), metabolizadores lentos 5-10 % de la población.
- Con actividad ultrarrápida (ultrarapid metabolizer,UM), metabolizadores ultrarrápidos 1- 10% de la población (Cascorbi, 2003) **(Figura 4).**

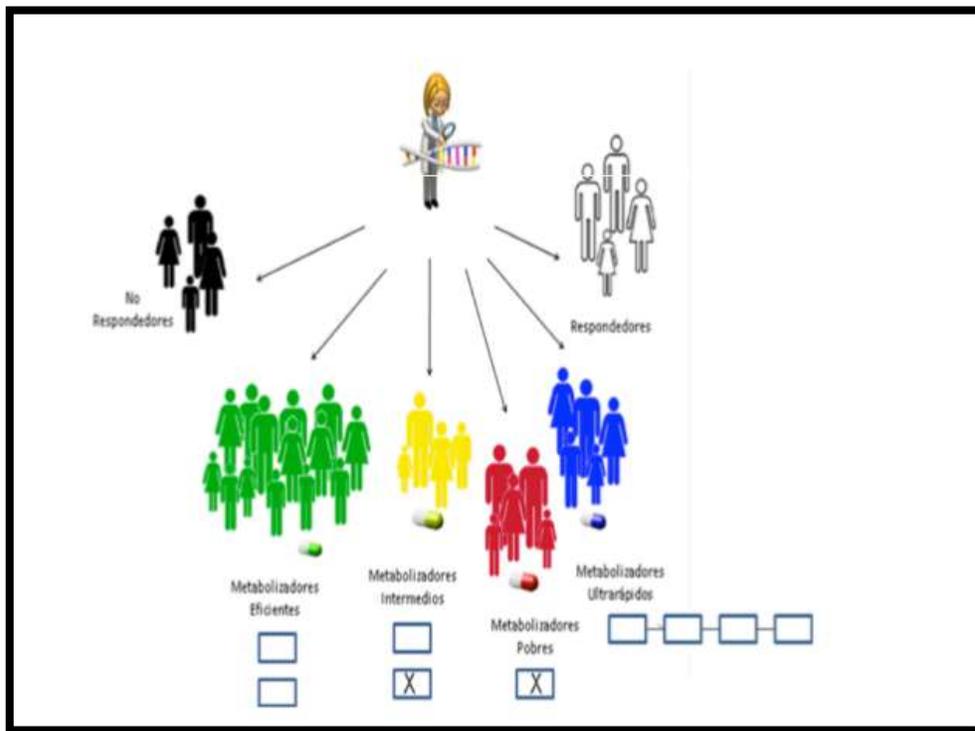


Figura 4. Variabilidad metabólica en la respuesta a fármacos (Belloso & Redal, 2010).

La modificación consecuente de la dosis o del intervalo interdosis que permita conseguir el rango deseado de concentración plasmática del fármaco y evitar así la sobredosificación en metabolizadores lentos y la dosis subterapéutica en metabolizadores rápidos o ultrarrápidos, en los casos de biotransformación a productos inactivos es uno de los objetivos principales de la prescripción individualizada (Evans W. , 2013).

Lógicamente, para el caso menos frecuente de los profármacos que requieren algún paso metabólico para su transformación en compuestos activos, tales como codeína, tramadol, tamoxifeno entre otras, los metabolizadores ultrarrápidos deberían recibir menores dosis y aquellos individuos deficitarios en enzimas metabolizadoras deberían preferiblemente recibir fármacos alternativos.

Por el momento el estado del conocimiento se restringe primariamente a disminuir el riesgo de toxicidades y usos innecesarios de drogas, en lo que algunos autores han denominado “farmacogenética de seguridad” (Belloso & Redal, 2010).

3.2 Blancos de acción de drogas

La variabilidad genómica que se presenta sobre las enzimas de biotransformación y los transportadores ha sido la más estudiada dentro del campo de la Farmacogenómica, esto se debe principalmente a que los efectos sobre la farmacocinética de las drogas son muy notorios y producen las comunes reacciones adversas medicamentosas.

Sin embargo, en relación con la farmacodinamia que es la rama que estudia los blancos terapéuticos, en la actualidad también goza de gran interés. Los receptores, moléculas proteicas que reciben señales químicas desde la parte externa de las células y las traducen en un efecto, han mostrado que igualmente son muchos y muy variados blancos de unión a fármacos

A diferencia de la evaluación de los determinantes genéticos de enzimas biotransformadoras y proteínas de transporte que constituyen vías comunes para distintos tipos de fármacos, el estudio de polimorfismos en genes que regulan la expresión de sitios de acción de fármacos es potencialmente tan diverso como las familias de fármacos disponibles. Existen múltiples desarrollos orientados a predecir la acción farmacológica de drogas o sus efectos adversos (Evans & Mcleod , 2014).

En la actualidad también se conoce que muchos desordenes funcionales están atribuidos a los cambios genéticos en los receptores. Por mencionar algunos ejemplos se encuentre el síndrome QT largo, la insensibilidad a andrógenos , la predisposición a cáncer de próstata y la alteración del receptor de ácido retinoico en la leucemia promielocítica aguda (Weber, 2001).

4.0 Citocromo P450

Se denominan citocromos P450 (CYP) a un conjunto de isoenzimas localizadas principalmente en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias de los hepatocitos y en menor cantidad en diversos tejidos de órganos tales como cerebro, riñón, intestino y pulmón. En los mamíferos la mayoría de xenobióticos son metabolizados en el hígado en la fase I de la biotransformación, y en el humano más de 30 isoformas de enzimas CYP son responsables del metabolismo de diferentes compuestos.

La superfamilia P450 está formada por familias y subfamilias de acuerdo con el grado de similitud de la secuencia de aminoácidos; las isoformas de una misma familia son homólogas en el 40 % de la secuencia de aminoácidos, mientras que las subfamilias en más del 55% con algunas excepciones. En humanos de los más

de 50 CYP conocidos, solo tres familias de enzimas tienen una contribución relevante en el metabolismo de fármacos y xenobióticos: *CYP1*, *CYP2* y *CYP3* (Kitagawa, Kunugita, Katoh, Yang, & Kawamoto, 2016).

En la familia CYP2 las isoformas CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19 son las de mayor importancia clínica. La enzima CYP2D6 interviene en el metabolismo del 25 % de los fármacos, por lo que la presencia de variantes alélicas del gen CYP2D6 ha generado gran interés en farmacología clínica. A la fecha se han identificado más de 30 alelos defectuosos de la enzima CYP2D6 los cuales originan un metabolismo lento. Las principales variantes alélicas asociadas al metabolismo lento son *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*7* y *CYP2D6*8*

Las principales variantes alélicas de CYP2D6 asociadas al metabolismo intermedio son: *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17*, *CYP2D6*18* y *CYP2D6*36* (Hart & Jones, 2010).

4.1 Nomenclatura de enzimas del CP450

La nomenclatura estándar de las enzimas del citocromo P450 utiliza la raíz CYP seguida de un número arábigo que designa la familia de enzimas sobre la base de una identidad aminoacídica de más del 40%, una letra para designar la subfamilia con una identidad de más del 55% y otro número que denota la enzima individual, por ejemplo: CYP2D6*4. Para cada enzima el alelo silvestre se designa con *1 y las variaciones alélicas se enumeran de manera secuencial según han sido identificadas (es decir, *2, *3, etc.). Las enzimas del sistema citocromo P450 son importantes tanto en la biosíntesis como en la degradación de compuestos endógenos (esteroides, lípidos y vitaminas, etc.); además, metabolizan muchas sustancias químicas presentes en la dieta, en el ambiente y también los fármacos (Belloso & Redal, 2010).

4.2 Características generales de la enzima CYP2D6

La enzima CYP2D6 contiene 497 aminoácidos en su estructura entre el 1.5 al 2.0 % del total de isoenzima; sin embargo, es una de las más importantes ya que participa en el metabolismo del 25% de los fármacos de uso clínico entre los que se encuentran antidepresivos, antihipertensivos, antiarrítmicos, inhibidores de recaptación selectiva de serotonina, opiáceos y neurolépticos. Los diferentes modelos de la enzima se basan en la estructura tridimensional del citocromo bacteriano P450 BM3 de *Bacillus megaterium* o del CYP2C5 de conejo ambos obtenidos por mutagénesis dirigida, por lo que difieren entre sí. A pesar de tener las isoenzimas cristalizadas tales como CYP2B4, CYP2C5 y CYP2V9; aún no se obtienen los isómeros de CYP2D6 estos son necesarios para conseguir un modelo tridimensional y predecir los fármacos que actuarían como sustratos de baja afinidad para el caso de los metabolizadores lentos (Gonzalez F. , 2016).

Aunque no se han desarrollado criterios para evaluar estructuralmente si un compuesto es metabolizado por esta enzima, se observa que la mayoría de los sustratos de CYP2D6 son bases lipofílicas que tienen en su estructura un átomo de nitrógeno protonado. La reacción de hidroxilación se inicia a una distancia de 5 a 7Å del átomo de nitrógeno (Avisé, 2004).

Diversos experimentos indican que los aminoácidos A301 de carga negativa, es el responsable de la unión al sustrato; así como la S 304 y V 370 han sido involucrados en la unión con el sustrato, sin embargo, se requiere mayores estudios para su confirmación (Belloso & Redal, 2010).

La enzima CYP2D6 posee una elevada afinidad por los alcaloides, a diferencia de otras isoenzimas metabolizadoras de xenobióticos; no es regulada por agentes ambientales ni inducida por hormonas y no presenta alguna función endógena relevante. Estudios recientes han evidenciado que la isoenzima de CYP2D6 presenta una acción específica sobre la 5- metoxindoletilamina y la 5-metoxihidroxitriptamina por lo que es probable también que la enzima tenga un papel principal en el metabolismo de alimentos de origen vegetal (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

4.2.1 Evolución del locus CYP2D6

La evolución del locus CYP2D humano ha implicado la inactivación de los genes CYP2D7 y CYP2D8 además existe una diferencia entre el número de genes activos de los roedores y de los humanos, ya que los primeros presentan nueve genes CYP2D6 activos, mientras que el humano presenta solo uno, por lo que los ratones tienen más genes activos de CYP2D6 para detoxificar compuestos propios de su dieta (Frye, 2010).

4.2.2 Genética molecular del gen CYP2D6

El gen CYP2D6 está localizado en el cromosoma 22q13.1, adyacente a los dos pseudogenes CYP2D7P y CYP2D8P que fueron clonados y secuenciados por Kimura y col (1989). La secuenciación del gen CYP2D6 incluyó las zonas no traducidas 5' y 3' que miden 1531 y 3522 pares de bases (pb) respectivamente, y los 4378 pb corresponden a la zona codificadora con nueve exones y ocho intrones. La caja TATA se encuentra en las posiciones 24 y 28 pb lugar donde se une la RNA polimerasa (Cozza & Armstrong , 2001).

La secuenciación de CYP2D7 reveló que es un gen aparentemente normal, excepto por la inserción de una T en la posición 226 en el exón 1, lo cual origina la interrupción de la lectura de la zona codificadora y una terminación prematura en las bases 2587 a 2589 en el exón 5 del gen CYP2D7, lo que probablemente podría originar un ARNm inestable. El pseudogen CYP2D8 presenta múltiples deleciones e inserciones en los exones originando la interrupción total del marco de lectura abierta; otra particularidad es la presencia de una inserción Alu en el intrón 1; este tipo de elementos nucleares dispersos cortos (SINES) de aproximadamente

300 pb se encuentran distribuidos aleatoriamente en el genoma humano. Los pseudogenes CYP2D7P presentan una similitud de 92 % y 97% con la secuencia del gen CYP2D6 respectivamente (Shi MM, 2001).

4.2.3 Variantes Alélicas CYP2D6 normales

CYP2D6*1 es uno de los alelos funcionales más comunes, codifica la enzima asociada con un índice metabólico normal; aquellos individuos que sean homocigotos o heterocigotos para estos alelos son clasificados como metabolizadores rápidos.

Existen cinco subtipos de la variante *1A, *1b, *C, *D y *E, que se diferencian en la posición de las mutaciones silenciosas.

CYP2D6*2 se caracteriza por presentar sustituciones de citosina por timina en el exón 6 y guanina por timina en el 9, originando el cambio de dos aminoácidos Arg296Cys y Ser486Thr en la estructura de la proteína; estos cambios aminoácídicos no alteran la actividad enzimática de CYP2D6. Existen 11 subtipos dentro de esta variante *2A, *2B, *2C, *2D, *2F, *2G, *2H, *2I, *2J, *2K y *2L que comparten las mismas sustituciones nucleotídicas a nivel de los exones 6 y 9; y que se diferencian en las mutaciones silenciosas presentes en la secuencia del gen (Higgins & Stearns, 2010).

4.2.4 Alelos CYP2D6 asociados a metabolismo lento

Se conocen alrededor de 30 alelos defectuosos de la enzima CYP2D6, los cuales tendrán como fenotipo un metabolismo lento. Siendo los alelos no funcionales más comunes: CY2D6*4, CY2D6*3, CY2D6*5, CY2D6*7 y CY2D6*8.

El CY2D6*4, fue la primera variante alélica asociada a metabolismo lento en ser identificada por Kimura y col. en 1989, presenta una sustitución de una guanina por una adenina en la posición 1934 entre los intrones 3 y 4; lo que origina una alteración en el procesamiento del RNAm. Todas las variantes *4 se caracterizan por presentar el defecto en el procesamiento de RNAm mientras que cada subtipo tendrá sus características propias.

Los subtipos *4A y *4B presentan un cambio nucleotídico de citosina por timina en la posición 100 del exón 1 originando Pro34Ser, la prolina es altamente conservada en su posición y arreglo Pro Gly-Pro, lo cual enlaza la secuencia hidrofóbica de la membrana a la porción globular de la enzima. Además, presenta tres sustituciones nucleotídicas; de citosina por adenina en la posición 974, de adenina por guanina en la posición 984 en el exón 1 y un cambio de guanina por citosina en la posición 4180 del exón 9; produciendo cambios de aminoácidos en la estructura de la proteína Leu91Met, His94Arg y Ser486Thr respectivamente.

El CYP2D6*4C presenta una sustitución de timina por citosina en la posición 3887 del exón 8 produciendo un aminoácido diferente Leu421Pro; además de los cambios de Pro34Ser y Ser486Thr, el subtipo CYP2D6*4M presenta los cambios de Leu91Met y His94Arg en la estructura de la proteína.

CY2D6*3 presenta una delección de adenina en la posición 2549 en el exón 5 del gen; originando un desplazamiento del marco de lectura del RNAm y en consecuencia se produce una enzima inactiva; mientras que el subtipo *3B además presenta un cambio de adenina por guanina en la posición 1749 en el exón 3 produciendo un cambio de Asn166Asp (Eichelbaum & Burk, 2001).

CY2D6*7, presenta un cambio de adenina por citosina en la posición 2935 en el exón 6 que produce el cambio de His324Pro; originando una enzima inactiva.

CY2D6*8, presenta una sustitución de guanina por timina en la posición 1758 iniciando el exón 3, lo que origina el codón UGA de parada y una proteína truncada (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

4.2.5 Alelos CYP2D6 asociados a metabolismo intermedio

Las principales variantes alélicas de actividad reducida de la enzima CYP2D6 son: CY2D6*10, CY2D6*17, CY2D6*18 y CY2D6*36

La isoforma CY2D6*10 presenta sustituciones de citosina por timina en la posición 100 del exón 1 de una guanina por citosina en la posición 4180 del exón 9; produciendo cambios de Pro34Ser y Ser486Thr en la estructura de la proteína respectivamente. Los subtipos *10A, *10B, *10C y *10D comparten las dos sustituciones de nucleótidos mencionados y se diferencian en las mutaciones silenciosas presentes en la secuencia del gen.

CY2D6*17 presenta tres sustituciones nucleotídicas, una citosina por timina en la posición 1023 del exón 2, una citosina por timina en la posición 2850 del exón 6 y un cambio de guanina por citosina en la posición 4180 del exón 9; produciendo cambios de Thr107Ile, Arg296Cys y Ser486Thr respectivamente en la estructura de la proteína.

CY2D6*18 presenta una inserción de nueve nucleótidos GTGCCCACT en el exón 9 entre la posición 4125 y 4133.

CY2D6*36 presenta múltiples cambios nucleotídicos en el gen CYP2D6, originando las siguientes modificaciones aminoacídicas: Pro34Ser, Pro469Ala, Thr470Ala y Ser486Thr que conllevan a una enzima inactiva (Ingelman-Sundberg, 2015)

4.2.6 CYP2D6 y el metabolismo ultrarrápido

Los individuos portadores de los alelos que llevan duplicaciones del gen CYP2D6 presentan un metabolismo ultrarrápido. Inicialmente el CY2D6*2 aparecería en la duplicación, pero estudios recientes han demostrado

que también están presentes en duplicaciones las variantes CYP2D6*1X2 y CYP2D6*35X2 (Lovlie, Daly, Molven, Idle, & Steen, 2017).

5.0 Evaluación de la actividad individual del CYP2D6

La actividad del CYP2D6 se puede determinar usando un fármaco trazador como sustrato cuyo metabolismo es conocido. La excreción del compuesto o metabolitos del marcador en la orina permiten calcular la concentración del fármaco metabolizado, de esta forma se mide indirectamente la actividad de la enzima CYP2D6. Los fármacos más usados para determinar esta actividad son la esparteína, el metoprolol, la codeína y el dextrometorfano. Este último, es el más usado debido a su disponibilidad como medicamento OTC (over the counter, de venta sin prescripción) en la mayoría de los países (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

El análisis metabólico de fármacos en pacientes presenta serias dificultades debido a que cuando se co-administran estos, se confunde el efecto adverso con la enfermedad. Además, si los fármacos inhiben la actividad enzimática ocasionarían la disminución de metabolitos en la orina y aparentemente se trataría de un metabolismo lento. De esta forma, se evalúa la función de la enzima y se detectan las interacciones o los defectos en el metabolismo de fármacos (Koch, 2014). La genotipificación implica la identificación de mutaciones génicas específicas, (tabla 5.1), estas incluyen alteraciones en la expresión por aumento, ausencia o disminución de la actividad catalítica. Con este análisis del genoma se evitan todos los inconvenientes arriba señalados.

Tabla 2 Mutaciones más frecuentes detectadas en el gen CYP2D6 (Belloso & Redal, 2010).

Alelo CYP2D6	Nucleótido cambiante	Actividad enzimática
*1	Alelo silvestre	Normal
*2	2850 C/T	Normal
*3	2549 A / deleción	Ninguna
*4	1846 G/A	Ninguna
*5	Deleción del gen	Ninguna
*6	1707 T 7 deleción	Ninguna
*7	2935 A /C	Ninguna
*8	1758 G/T	Ninguna
*9	2613-2615 del AGA	Intermedia
*10	883G/C	Ninguna
*11	124 G/A	Ninguna
*12	124 G/A	Ninguna
*17	1023 C/ T	Intermedia
Duplicación del gen	Multiplicación del gen	Incrementada (según el número de copias)

Para llevar a cabo este tipo de análisis, se requiere de una pequeña muestra de sangre o tejido como fuente de DNA. Comúnmente, la PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismos en Longitud de los Fragmentos de Restricción) y otras variantes de la PCR son usadas para esta evaluación. Las micromatrices también son útiles en la detección de la variación génica responsable del metabolismo y la respuesta diferenciada de los individuos a un mismo fármaco. La genotipificación clasifica a una población en estudio en cuatro grupos, en base a su capacidad de metabolización de los xenobióticos (Cozza & Armstrong , 2001).

Los metabolizadores: a) rápidos tienen la capacidad metabólica normal con dos alelos CYP2D6 activos, b) intermedios combinan un alelo activo y otro inactivo, c) lentos presentan dos alelos inactivos o uno parcialmente activo y d) ultrarrápidos incluyen tres o más alelos CYP2D6 activos debido a la amplificación génica.

La ausencia de una mutación perceptible no excluye la posibilidad que un paciente tenga un metabolismo lento o intermedio (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

5.1 Dosificación según fenotipo CYP2D6

Se recomienda que se realice el seguimiento del tratamiento en pacientes con variaciones alélicas de la enzima CYP2D6, debido a que disminuye o aumenta la capacidad de eliminar el fármaco.

Un factor importante para correlacionar el genotipo con el fenotipo de CYP2D6 es que muchos fármacos pueden inducir o inhibir la actividad catalítica. Por consiguiente, en un individuo se puede cambiar la dosis en base al genotipo. Por ello, es importante la interpretación de los resultados en el contexto de la co-administración de otros fármacos.

Los pacientes con metabolismo rápido o intermedio pueden tener la actividad de enzima CYP2D6 inhibida por una variedad de fármacos o sus metabolitos, incluyendo muchos antagonistas del receptor de histamina H1. El tratamiento con inhibidores de CYP2D6 puede cambiar el metabolismo rápido o intermedio a lento (Kitagawa, Kunugita, Katoh, Yang, & Kawamoto, 2016).

5.1.1 Metabolizadores lentos.

Se deben evitar los fármacos que son modificados a su forma activa por CYP2D6, es decir los profármacos como los opioides. Por ejemplo, el 10 % de una dosis de codeína es transformado a morfina por desmetilación en el hígado; por otro lado, que se debe reducir la dosificación de los fármacos que son administrados en formas activas como por ejemplo los antidepresivos que son metabolizados por CYP2D6 (Belloso & Redal, 2010).

5.1.2 Metabolizadores ultrarrápidos

La dosificación para metabolizadores ultrarrápido se debe aumentar, en el caso de fármacos que no necesiten activarse; mientras que la dosificación se debe disminuir en el caso de los profármacos como codeína ya que causaría toxicidad con consecuencias serias (Belloso & Redal, 2010).

5.1.3 Metabolizadores intermedios

Las personas de metabolismo intermedio deben empezar la terapia con la menor dosis eficaz. Los cambios de la capacidad metabólica de un individuo no cambian la acción farmacológica de la medicación, por lo tanto los intervalos de concentración estándar del fármaco pueden ser usados para optimizar la dosificación (Belloso & Redal, 2010).

6.0 Perspectivas futuras del estudio de la variabilidad del gen CYP2D6

La determinación de polimorfismos genéticos de CYP2D6 es de gran valor clínico para ajustar la dosificación de fármacos que son sustratos de esta enzima y que poseen una ventana terapéutica estrecha. La genotipificación de CYP2D6 mediante técnicas de biología molecular permite obtener información valiosa que ayudaría a los médicos a prescribir un fármaco según el paciente y de este modo disminuir las hospitalizaciones debidas a las reacciones adversas, o la selección alternativa de un fármaco de la enzima CYP2D6.

Recientemente (2015) la Agencia para la Administración de los Alimentos y Drogas de Estados Unidos ha aprobado dos pruebas farmacogenéticas disponibles comercialmente que apoyan la personalización del tratamiento farmacológico. Estas pruebas detectan variaciones en los genes que codifican para dos enzimas metabolizadoras de drogas CYP2D6 y CYP2C19 (**Roche AmpliChip,**) y UGT1A1 (**Molecular Assay; Third Wave Tech**) (McCarthy & Davies, 2002).

Se predice que la próxima década el mercado de las pruebas moleculares diagnósticas aumente de manera considerable, potenciado por la farmacogenética y el sueño elusivo de una medicina personalizada. El reto es manejar las expectativas de la comunidad médica y de los pacientes que han sido alentadas por las noticias repetidas de grandes descubrimientos genéticos.

En el caso de CYP2D6 la implementación de pruebas moleculares rápidas y de gran precisión puede tener una gran aplicación clínica en psiquiatría ya que esta enzima interviene en el metabolismo de muchos antidepresivos y antipsicóticos. En particular la genotipificación de CYP2D6 puede ser importante para los individuos metabolizadores lentos bajo tratamiento con antidepresivos tricíclicos venlafaxina, antipsicóticos típicos y risperidona (Licio & Wong, 2008).

La determinación genética de CYP2D6 tiene la ventaja adicional de permanecer estable durante la vida de las personas, por lo que es potencialmente útil en las estrategias de prescripción racional de los medicamentos. Sin embargo, es importante señalar que el uso y la utilidad de las pruebas farmacogenéticas para reducir las reacciones adversas y mejorar la eficacia de los fármacos debe ser probada por estudios clínicos prospectivos y estudios farmacogenómicos relacionados que demuestren el beneficio de la genotipificación para estos propósitos (Cozza & Armstrong , 2001).

Una de las barreras más importantes para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica es la educación de esta disciplina, no solo en los profesionales de la salud sino también en el público en general. Los médicos clínicos tienden a ignorar la gran cantidad de información farmacogenética nueva y la ven como una carga adicional y una complicación para el complejo proceso de decisión terapéutica. Esto parece ser resultado de la falta de educación de esta ciencia y del potencial que la genómica ofrece en la aplicación media de esta tecnología. La educación genética a nivel de pregrado, posgrado y educación continua ha ido rezagada del enorme avance científico y técnico de área, por lo que es imperativo el diseño de nuevos programas educativos en el área de la salud que incluyan los principios y aplicaciones de la Farmacogenómica (Shi MM, 2001).

7.0 Composición de la sangre

La sangre humana está compuesta de un 22 por ciento de elementos sólidos y un 78 por ciento de agua. Los componentes de la sangre humana son:

- El plasma, en el que están suspendidas las células sanguíneas, incluye:

Glóbulos rojos (eritrocitos) - transportan oxígeno desde los pulmones hacia el resto del cuerpo.

Glóbulos blancos (leucocitos) - ayudan a combatir las infecciones y asisten en el proceso inmunológico. (Ruiz, 2012).

Sin embargo, dentro de los glóbulos blancos encontramos diferentes componentes celulares y componentes químicos los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3 Componentes celulares y químicos de la sangre (Ruiz, 2012).

Componentes celulares	Componentes químicos
Linfocitos	Carbohidratos
Monocitos	Proteínas
Eosinófilos	Hormonas
Basófilos	Oxígeno
Neutrófilos	Dióxido de carbono
Plaquetas	Nitrógeno

7.1 Composición de la saliva

La saliva contiene electrolitos y proteínas. La composición de proteínas. La composición electrolítica de la secreción primaria de la saliva producida por las células acinares se asemeja a la del plasma. Sin embargo, los conductos estriados y excretores modifican dicha secreción y la transforman en hiposmótica. En la saliva hay menos Na^+ menos Cl^- , más K^+ y más HCO_3^- que, en el plasma, debido a que el Na^+ y el Cl^- se reabsorben y los iones K^+ y HCO_3^- se secretan. La secreción de HCO_3^- se acompaña de un transporte de H^+ hacia la sangre. (Koolman, 2009).

Con respecto a la composición proteica de la saliva las dos proteínas fundamentales que están presentes son la amilasa y la mucina. La amilasa la produce fundamentalmente las glándulas parótidas y la mucina las glándulas sublinguales y submaxilares. La amilasa es una enzima hidrolítica que interviene en la digestión del almidón (Galvez, 2010).

7.2 Extracción de DNA utilizando sangre y saliva

El primer paso en cualquier análisis genético suele ser el aislamiento del material genético. Los métodos de extracción del DNA se remontan a 1869 cuando Miesher consiguió extraer del esperma de salmón y de los leucocitos humanos lo que entonces se denominó nucleína y que hoy en día se conoce como DNA.

Para aislar el DNA a partir de una muestra de sangre se procede a lisar los eritrocitos con choque hipotónico y en presencia de detergentes para eliminar el exceso de hemoglobina. Subsiguiente se tratan los núcleos de los leucocitos con proteínas y se procede a la purificación del DNA a través de extracción clorofórmica de las proteínas y la precipitación del DNA con etanol (Ruiz, 2012).

El DNA extraído de esta forma es apto para la mayoría de las técnicas de análisis genético molecular.

La extracción de DNA a partir de saliva se basa en el mismo fundamento que en el caso de la sangre, la diferencia principal es el tipo de célula en cual se lleva a cabo la lisis para la liberación del material genómico. En el caso de la saliva fresca las células de descamación de la mucosa oral son las que sufren esta lisis para liberar el material genómico (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

En un sin número de estudios genéticos la calidad del DNA a utilizar es primordial, así como la pureza (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Usualmente en este tipo de estudios en los cuales se requiere un DNA íntegro se prefiere utilizar sangre periférica como muestra biológica para la extracción del material genético puesto que con un buen método de extracción se logra obtener de 10 a 15 μg de DNA por mL de sangre obtenida.

Sin embargo, con el paso del tiempo y el avance de la tecnología se ha descubierto que no solo se puede obtener DNA de buena calidad a partir de sangre. La venopunción puede llegar a resultar riesgosa y dolorosa tanto para los pacientes como para el personal que se encarga de tomar la muestra , en realidad muchos sujetos de estudio dentro de protocolos de investigación se niegan a participar pues la venopunción resulta bastante incómoda y dolorosa para ellos, en cuanto al DNA extraído a partir de sangre se ha notado que fácilmente puede degradarse con el paso del tiempo y de esta forma la muestra ya no es viable para utilizarla y obtener un resultado óptimo.

Otro factor importante que considerar en el uso de sangre es la presencia de iones de hierro (Fe^{2+}) el cual compite con iones de (Mg^{2+}) los cuales pueden inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

En general, el estudio molecular requiere de diferentes etapas de procesos, siendo la extracción de DNA la más importante para lograr obtener resultados óptimos en un diagnóstico molecular. Debido a las razones planteadas anteriormente se decidió buscar por técnicas alternativas para poder obtener DNA, en la cual el uso de saliva fresca resulta ser una de las mejores alternativas logrando resultados de gran calidad.

Las glándulas sublinguales, parótidas y sub-mandibulares secretan saliva. Aproximadamente cada 2.7 horas se genera nueva saliva al día esta saliva recién formada está compuesta de aproximadamente 75% de células epiteliales (430,00 células/ mL) y el 25 % leucocitos (2 a 136,00 celular / mL) esto depende de la salud bucal del individuo (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Endler y colaboradores en 1999 encontraron que al menos el 58% de las células epiteliales presentes en una muestra de saliva fresca presentan DNA intacto, su protocolo de extracción lo basó en el método de Sambrook, et al. (1988) en el cual la extracción la lograba a partir de leucocitos en sangre y con mayor facilidad en comparación a la extracción a partir de células epiteliales en saliva (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

En el 2003 Dawes encontró que en la saliva de sus pacientes regularmente contaban aproximadamente con 430,000 células epiteliales/ mL, 1.36×10^5 leucocitos y 1.7×10^7 bacterias acompañado de DNA de otros microorganismos encontrados en la cavidad oral. Además, la saliva y células de la mucosa oral pueden ser recolectadas usando una variedad de métodos como:

- Salivación
- Hisopos de algodón
- Cepillos citológicos
- Enjuagues bucales con solución salina

Estos métodos permiten que la recolección de muestra de saliva sea cómoda tanto para el tomador como para el paciente y reduce considerablemente la transmisión de enfermedades.

Otros componentes de la saliva como enzimas, hormonas, inmunoglobulinas y otras biomoléculas también pueden interferir con la cantidad y calidad del DNA extraído. Los mismos cuidados para una muestra de DNA obtenida a partir de sangre como de saliva tienen que ser los mismos para la preservación de esta.

Según la genoteca de DNA (DNA Genotek: Ottawa, Ontario Canadá) la saliva puede ser almacenada de más o menos 5 años en un cuarto con temperatura regulada de 2 a 8°C.

Sin embargo, Kuchler, et al. Evaluó la calidad de muestras de saliva almacenadas bajo temperatura de 2 a 8°C y de saliva almacenada a temperatura ambiente, las muestras fueron analizadas después de 4 a 8 días de almacenaje (Minaguchi & Bennick, 2014).

Los resultados obtenidos en cuanto a la calidad no varían con importancia estadística, sin embargo, encontraron en aquellas muestras que fueron almacenadas a temperatura ambiente un crecimiento de bacterias lo cual puede llegar a interferir con estudios moleculares. Otros estudios indican que la estabilidad de una muestra de saliva fresca en congelación puede ser hasta de 6 años (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Con esto se logra entender mejor el propósito y la utilidad de la extracción de DNA a partir de una muestra de saliva fresca.

Como ya se mencionó el citocromo CYP2D6 es un miembro del complejo enzimático P450. Interviene en el metabolismo de aproximadamente el 25% de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado. Se han identificado más de 70 alelos de este gen, cada uno de ellos, asociado a una determinada actividad de la enzima codificante. Esta gran variabilidad polimórfica implica la existencia de diversidad fenotípica a nivel individual para dicha enzima. Se han determinado cuatro fenotipos posibles en función de la actividad metabolizadora del CYP2D6: Los denominados metabolizadores lentos (PM), los intermedios (IM), los rápidos (EM), ultra rápido (UM).

La variante alélica *4 de CYP2D6, fue la primera variante alélica asociada a metabolismo lento, presenta una sustitución de una guanina por una adenina en la posición 1934 entre intrones3 y 4; lo que origina una alteración en el procesamiento del ARNm.

Diferentes estudios se han realizado para la detección de la variante alélica *4 de CYP2D6 en población mexicana los cuales muestran que frecuentemente se presenta alelos no funcionales o inactivos para CYP2D6 (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

Por esta razón el presente trabajo pretende demostrar la utilidad de la extracción de DNA a partir de una muestra de saliva fresca, logrando analizar este material hasta la detección de un polimorfismo de alto impacto en la salud de los seres humanos.

8.0 Justificación del trabajo de tesis

En estudios genómicos la extracción de DNA comúnmente se realiza a partir de muestras de sangre, En la actualidad la extracción de DNA se puede realizar casi de cualquier tejido, esto dependiendo de la naturaleza de la muestra biológica primaria y del objetivo del estudio a realizar. El uso de saliva como muestra primaria para la extracción de DNA ya se a utilizado en diferentes estudios presentando bueno resultados de integridad con los cuales se puede llevar a cabo un estudio genómico. Sin embargo, es importante evaluar ciertos factores que podrían dar falsos resultados a la hora de la detección de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) tanto para métodos cualitativos como cuantitativos. Por ejemplo, el tejido o tipo celular del que se parte suele ser muy importante. Es por ello que en esta investigación estudiaremos la pertinencia de utilizar la saliva en la detección del polimorfismo *4 de CYP2D6 ya que la toma de muestras de sangre suele ser extremadamente molesto para muchos pacientes, además la comparación de estas dos diferentes muestras biológicas pretende demostrar que el uso de saliva fresca para la extracción de DNA es de mayor calidad y da los mismos resultados que una muestra de DNA obtenida a partir de sangre periférica.

Por otro lado, el hecho de genotipificar el polimorfismo más frecuente en la población mexicana de CYP2D6 en jóvenes de nuestra población estudiantil podría tener un valor agregado en el impacto de la medicina personalizada en nuestra población, que es uno de los objetivos que persigue la Farmacogenómica.

9.0 Objetivo General

Genotipificar el polimorfismo *4 de CYP2D6 en una población juvenil, por el método PCR-Restricción, a partir de muestras de sangre y saliva para demostrar su pertinencia y aplicación.

9.1 Objetivos Particulares

- Realizar la extracción de DNA a partir de muestras biológicas de sangre y saliva fresca de una población de estudiantes de la FESC, utilizando el método de extracción de DNA **“Covarrubias y Buffone”** con modificaciones. (Miller, Dykes, & Polesky, 1988)
- Comparar la concentración e integridad de DNA obtenido a partir de sangre y saliva fresca para demostrar la validez y reproducibilidad en ambas muestras, y poder utilizar el DNA extraído para la detección del polimorfismo 4 de CYP2D6

- Llevar a cabo técnicas moleculares como PCR - Restricción enzimática de las muestras de sangre y saliva para la detección del polimorfismo 4 de CYP2D6.
- Comprobar que no existen alteraciones provocadas por los componentes de la saliva fresca durante el proceso de detección del polimorfismo, los cuales pudieran dar resultados falsos, los cuales se descartaran mediante la comparación de resultados entre muestras de sangre y saliva.

10. Metodología

Para realizar este trabajo se solicitó la participación de 50 alumnos de la FES-Cuautitlán de diferentes carreras. Se les tomaron 2 diferentes muestras biológicas:

- a) 5 mL de sangre periférica obtenida con sistema vacutainer
- b) 15 mL de saliva fresca a través de la recolección en un tubo de centrifuga cónico de 25 mL.

Los sujetos de estudio que decidieron participar en el proyecto, se les dio a leer y firmar un consentimiento informado (**el cual se anexa en el apéndice A**), acerca del procedimiento en el cual participarían. En este documento se explica el objetivo del trabajo y la utilización de su muestra.

Se incluyó un sistema de inclusión y exclusión para la selección de candidatos para participar en el proyecto, estos tendrían que contar con las siguientes características.

- a) Tener entre 20 y 25 años
- b) No ser fumadores.
- c) No padecer de ninguna enfermedad crónico-degenerativa.
- d) No estar bajo ningún tratamiento farmacológico.

Una vez establecido y seleccionado nuestro grupo de sujetos de estudio se procedió a la parte metodológica y técnica.

La detección del polimorfismo CYP2D6*4, se llevó a cabo gracias a una serie de procedimientos moleculares a partir de una muestra biológica primaria. Los pasos por seguir se pueden resumir de manera muy general de la siguiente forma

- **Toma de muestra biológica**
- **Extracción de DNA**
- **Análisis de DNA obtenido**
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**
- **Evaluación del amplificado**

- **Restricción enzimática**
- **Caracterización del polimorfismo**

10.1 Toma de Muestra biológica

Una vez aceptado el sujeto de estudio para su participación en el proyecto y teniendo firmado el consentimiento informado, se procede a la toma de muestra sanguínea y de saliva.

10.1.2 Extracción de sangre periférica

La muestra sanguínea fue tomada bajo condiciones de esterilidad con un sistema al vacío (Vacutainer) obteniendo 5 mL de sangre periférica en tubos de tapón amarillo los cuales contienen como anticoagulante ACD.

Una vez realizada la obtención de sangre entera mediante la venopunción se procederá a identificar la muestra con el ID correspondiente.

10.1.3 Recolección de saliva fresca

Para poder comenzar con la recolección de saliva fresca es importante mencionar que con anterioridad se le solicitó al sujeto no comer, beber o fumar nada por lo menos 3 hrs antes de la recolección, esto con la finalidad de que al recolectar la muestra esta no se vea contaminada con algún tipo de agente externo como comida, a algún aditivo de bebida.

Se le solicita al sujeto de estudio se enjuague la boca con agua potable, una vez enjuagada la cavidad bucal se procede con la recolección de la muestra de saliva por medio de salivación. A cada uno de los participantes se le proporcionó un tubo Falcón estéril de 25 mL para la recolección de la muestra.

Una vez recolectados los 15 mL de saliva fresca se le asigna el ID a la muestra de saliva y se procede inmediatamente al siguiente procedimiento.

10.2 Extracción de DNA a Partir de Sangre periférica

Una vez obtenida la muestra de sangre se transfieren 3 mL de sangre a un tubo cónico de 15 mL y se agrega tres veces el volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10 mM., Tritón 1%, Sacarosa 0.32M) a un pH= 7.6, y se invierte el tubo varias veces con la finalidad de homogenizar la muestra con este buffer.

Se procede a centrifugar a 4000 rpm durante 6 minutos y se decanta el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el paquete, una vez decantado se agrega 1 mL de buffer TTS y se agita con ayuda de un vórtex con la finalidad de resuspender el botón obtenido, (Este paso se repite 3 veces, hasta obtener un botón lo más claro posible, es decir con la menor cantidad de eritrocitos).

Ya que se obtiene un botón claro se añade 1 mL de TTS se resuspende y se transfiere a un tubo de 1.5 mL, se centrifuga a 14000 rpm durante 6 min a 4° C, se decanta y se añade 1 mL de TTS, se resuspende con ayuda de un vórtex (repetir 2 veces más este procedimiento con la finalidad de lisar el mayor número de células).

Al botón limpio se le agregan 570 µL de NaCl 5 mM. Agitar durante 2 minutos con ayuda de un vórtex a velocidad media y agregar 30 µL de SDS al 10 %. Agitar durante 5 minutos y agregar 200 µL de NaCl saturado. Agitar durante 10 minutos

Terminando la agitación centrifugar a 14000 rpm durante 15 min a 4° C. decantar el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y agregar 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), mezclar suavemente durante 10 minutos, centrifugar a 14000 rpm a 4° C durante 15 minutos.

Tomar la fase superior y pasarla a un tubo cónico de 15 mL. Agregar el doble del volumen de etanol absoluto frío para precipitar el DNA con agitación suave.

Centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4° C y decantar cuidadosamente sin perder el botón, agregar 500 µL de etanol al 70 % frío, resuspender el botón y centrifugar a 11000 rpm a 4° C durante 10 minutos. Decantar (repetir este paso una vez más).

Secar el botón de DNA y resuspender en un máximo de 200 µL de agua estéril.

10.2.1 Extracción de DNA a partir de Saliva fresca

Una vez que se obtuvo la muestra, se transfieren 5 mL de saliva a un tubo cónico de 15 mL y se agrega tres veces el volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10 mM, Tritón 1%, Sacarosa 0.32M) con un pH= 7.6, y se invierte el tubo varias veces con la finalidad de homogenizar la muestra con este buffer.

Se procede a centrifugar a 4000 rpm durante 6 minutos y se decanta el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el paquete que se obtiene en la parte inferior del tubo cónico, una vez decantado se agrega 1 mL de buffer TTS y se agita con ayuda de un vórtex con la finalidad de resuspender el botón obtenido. (Este paso se repite 1 vez más, hasta obtener un botón lo más claro posible). En comparación con la extracción DNA a partir de sangre el botón se obtiene de forma más rápida a partir del segundo lavado.

Ya que se obtiene un botón claro se añade 1 mL de TTS se agita y se transfiere a un tubo de 1.5 mL, se centrifuga a 14000 rpm durante 6 min a 4° C, se decanta y se añade 1 mL de TTS, se agita con ayuda de un vórtex (repetir 2 veces más este procedimiento con la finalidad de lisar el mayor número de células).

A partir de este paso, el procedimiento es el mismo que se realizó en la extracción de DNA a partir de la muestra de sangre, hasta secar el botón y resuspender en un máximo de 200 µL de agua estéril.

10.3 Cuantificación de DNA obtenido

Posterior a la extracción, el DNA obtenido se cuantificará utilizando un espectrofotómetro NuDrop de la marca SENASS-NAS

Esta cuantificación nos proporciona la concentración de DNA obtenido en ng /µL así como las absorbancias en 260 nm y 280 nm, y la relación entre ambas.

En resumen, se coloca 1 µL de la muestra de DNA extraído a cuantificar e identificar con el ID de la muestra correspondiente y se manipula el espectrofotómetro para obtener las lecturas correspondientes.

10.3.1 Análisis de integridad de DNA

Una vez realizada la cuantificación se procede a determinar la integridad de la muestra, es decir, que tan viable es la muestra para seguir con la amplificación de la misma. Cabe mencionar que este paso es de suma importancia puesto que de ello depende el éxito de una amplificación en la PCR y una restricción enzimática correcta.

Este análisis se lleva a cabo con una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 120 V durante 20 min.

Se corren 2 µL de muestra, 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed. Se cargan en los pozos del gel previamente identificados en el primer pozo se coloca un control negativo (2 µL de C negativo, 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed) esto con la finalidad de demostrar que los reactivos a utilizar no están contaminados con material genético que pueda interferir con el estudio.

Transcurrido el tiempo de electroforesis el gel de agarosa se coloca en el Fotodocumentador (Smartview Pro 1100 Imager System) para observar nuestro DNA obtenido y evaluar su integridad

10.4 Amplificación del Gen CYP2D6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR- Punto Final)

Ya que se realizó el análisis de la integridad del DNA obtenido y asegurándonos que se obtuvo una buena concentración de este, se procede a la amplificación del gen CYP2D6 mediante la técnica de PCR de punto final.

Se utiliza el DNA extraído a partir de muestras de sangre y de saliva por el método de Covarrubias modificado para generar la amplificación. La reacción de PCR se realiza al generar una mezcla con el volumen total de los componentes necesarios en el total de reacciones a realizar para posteriormente alicuotar la mezcla en las reacciones individuales quedando los contenidos finales de cada reacción tal cual se muestra en la **Tabla 4**

Tabla 4 Componentes para PCR

Componente		Concen- tración	Volumen
DMSO		5%	1.5µL
Primer Forward	5'-GCC TTC GCC AAC CAC TCC G-3'	100 ng/µL	1µL
Primer Reverse	5'-AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC-3'	100 ng/µL	1µL
Agua libre de nucleasas		N A	6.5µL
MasterMix (Taq pol,dNTP,MgCl ₂ ,buffer)			15µL
DNA problema			5µL

Volumen total = 30 µL por reacción

NOTA: al tubo control o blanco se le adiciona agua libre de nucleasas en igual volumen

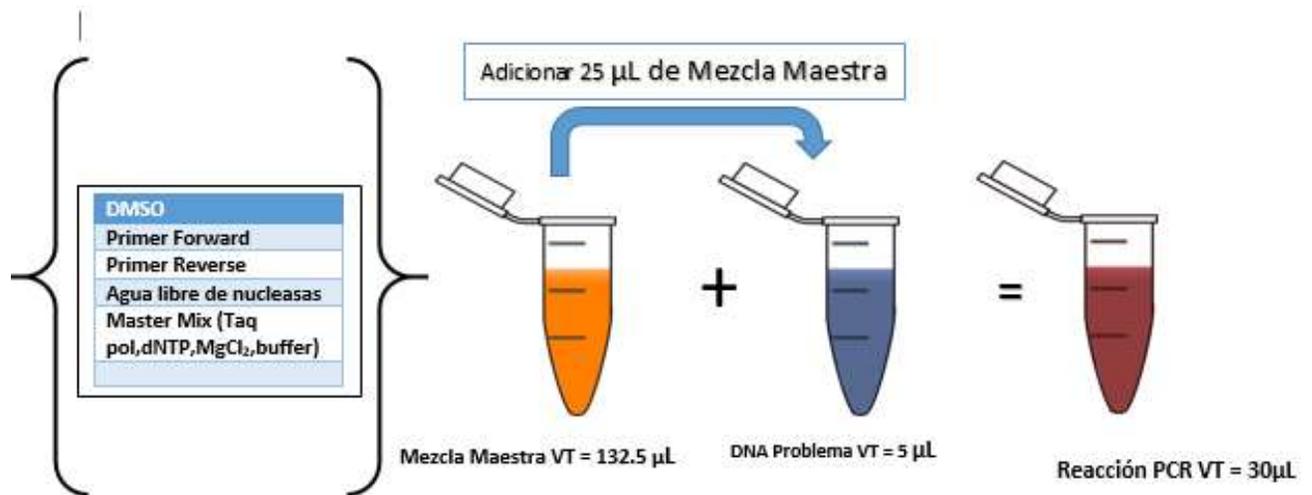


Figura 5. Componentes para reacción de PCR

Una vez realizada la mezcla PCR para cada una de las muestras (**Figura 5**) se introducen en el termociclador programado bajo las siguientes condiciones de ciclo: 94° C 5' (desnaturalización) → (94° C 1' → 60° C 1'

→ 72° C 1.4) 30 → ciclos → 72° C 10' → 4° C (indefinido).

10.5 Evaluación del amplificado

Los productos de PCR se analizarán mediante su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% a 120 Volts durante 30 min. Posterior al corrimiento electroforético, el gel se colocará en la foto documentadora para poder observar las bandas correspondientes del amplificado el tamaño del amplicon es de 355 pb.

Se corren 5 µL del producto de PCR, 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed. Se cargan en los pozos del gel previamente identificados en el primer pozo se coloca un control negativo (5 µL de master mix, 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed) esto con la finalidad de demostrar que los reactivos a utilizar no están contaminados con material genético que pueda interferir con el estudio.

10.6 Caracterización del polimorfismo *4 de CYP2D6 mediante restricción enzimática, utilizando la enzima *Micrococcus varians* (Mva1).

Los productos de PCR obtenidos se someten a un tratamiento enzimático de restricción utilizando a la enzima Mva1. (Tabla 5)

Tabla 5 Componentes para la restricción enzimática, por cada muestra.

Componente	Volumen
Producto de PCR	10 µL
Enzima Mva1	0.2 µL
Buffer 10xR	2 µL
H ₂ O inyectable	7.8 µL
Volumen total	20 µL

A cada producto de PCR obtenido para cada una de las muestras se realiza el tratamiento enzimático para determinar el polimorfismo correspondiente. Una vez realizada las alícuotas de la restricción enzimática correspondiente para cada producto de PCR esta se incuba a 37° C durante 3.5 h para favorecer la reacción enzimática. Esta incubación se realiza de igual forma en el termociclador teniendo un programa pre-establecido con las condiciones indicadas, este programa se encuentra con el nombre de CYP2D6 37° C.

Los productos de restricción enzimática se analizarán mediante su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 60 min. Posterior al corrimiento electroforético, el gel se coloca en el foto documentador para poder observar las bandas correspondientes de la restricción con lo cual se identificará si la muestra cuenta con el polimorfismo y de esta manera se determinará el fenotipo que presentará el paciente para el metabolismo de fármacos metabolizados por CYP2D6. Todos los geles se documentan con las fotos correspondientes.

Se corren 5 µL del producto de la restricción enzimática, 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed. Se cargan en los pozos del gel previamente identificados: en el primer pozo se coloca un control negativo (5 µL de los componentes necesarios para la restricción (Enzima Mva1, Buffer 10xR y H₂O inyectable), 1 µL de buffer de carga y 1 µL de GelRed) esto con la finalidad de demostrar que los reactivos a utilizar no están contaminados con material genético que pueda interferir con el estudio.

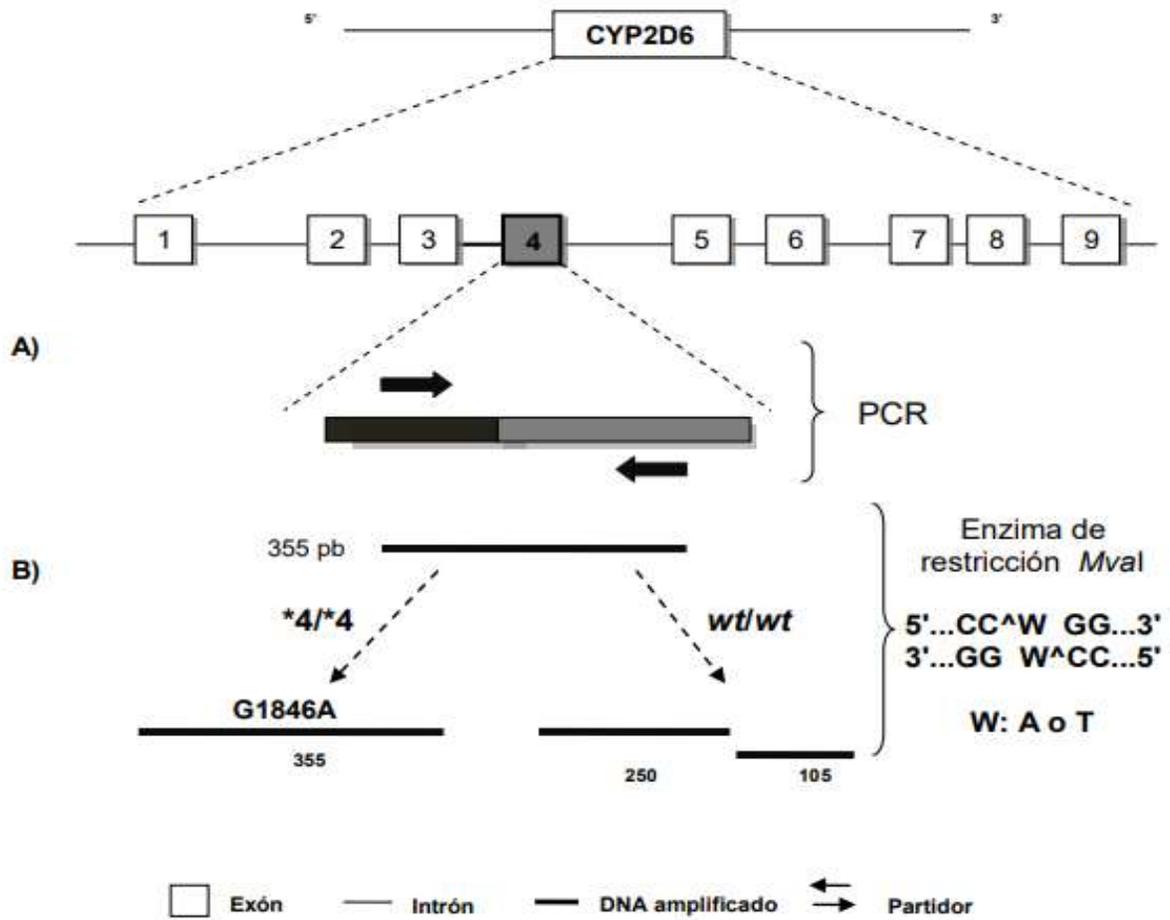


Figura 6. Digestión con la enzima *Mva1* del producto de la PCR para la detección del polimorfismo G1846A (Casas, Zavaleta, & H. Izaguirre, 2015).

11.0 Resultados

Tabla 6 Lecturas de los parámetros de concentración y Abs 260/280 de DNA obtenido a partir de muestras de sangre.

Sample ID	Abs260	Abs280	260/280	Con(ng/ul)
1	0.296	0.169	1.75	14.8*
2	0.716	0.839	1.85	35.8
4	0.046	0.016	2.87	2.3 *
4	0.043	0.004	2.56	2.2*
5	0.054	0.017	3.18	2.7*
6	0.042	0.006	2.40	2.1*
7	0.055	0.014	3.93	2.7*
8	0.117	0.048	2.44	67.8
9	0.095	0.03	3.17	48.7
10	0.064	0.009	4.11	39.2
11	8.347	4.766	1.75	417.4
12	18.745	10.75	1.74	937.3
13	9.805	5.013	3.4	64.89
14	0.697	0.7896	0.74	25.03
15	0.268	0.156	0.212	100.9
16	2.678	0.987	1.83	450.8
17	0.25	0.17	0.21	10.49*
18	0.456	0.45	0.453	156.89
19	0.9867	0.3	0.643	60.4
20	8.588	4.704	1.83	429.4
21	0.547	0.224	2.44	27.3
22	0.317	0.084	3.77	15.9
23	0.509	0.199	2.56	25.5
24	0.648	0.286	2.27	32.4
25	0.601	0.298	2.02	30.1
26	0.744	0.721	1.03	37.2
27	0.26	0.088	2.95	13*
28	0.087	0.042	2.07	4.3*
29	0.082	-0.04	2.05	4.1*
30	0.094	-0.013	7.23	4.7*
31	0.375	0.102	3.68	18.8
32	0.646	0.402	1.61	32.3
33	0.363	0.087	4.17	18.2
34	0.602	0.171	3.52	30.1
35	0.706	0.226	3.12	35.3
36	7.34	3.695	1.99	367
37	0.356	0.072	4.94	17.8
38	0.456	0.9	0.678	1.89*
39	5.67	3.98	4.825	267.9
40	0.363	0.087	4.17	18.2

41	0.602	0.171	3.52	30.1
42	0.706	0.226	3.12	35.3
43	7.34	3.695	1.99	367
44	0.356	0.072	4.94	17.8
45	0.547	0.224	2.44	27.3
46	0.317	0.084	3.77	15.9
47	0.509	0.199	2.56	25.5
48	0.648	0.286	2.27	32.4
49	0.601	0.298	2.02	30.1
50	8.588	4.704	1.83	429.4

*Muestras con concentraciones \leq a 15 ng/ul fueron cuantificadas por triplicado, se realiza cálculo de media de las diferentes cuantificaciones para cada muestra

Tabla 7. Estadística descriptiva de los parámetros del DNA obtenido de las muestras de sangre. Programa estadístico GraphPad Prism.

Parámetro Estadístico	Relación 260/280	[DNA] ng/ μ L
Media	2.988	86.84
Valor Mínimo	0.2100	1.490
Valor Máximo	10.75	937.3
Mediana	2.440	18.20
Desviación Estándar (SD)	2.082	181.1
Coefficiente de Variación (CV)	0.0069%	0.0208%

Desviación Estándar 260/280 (muestras de sangre)

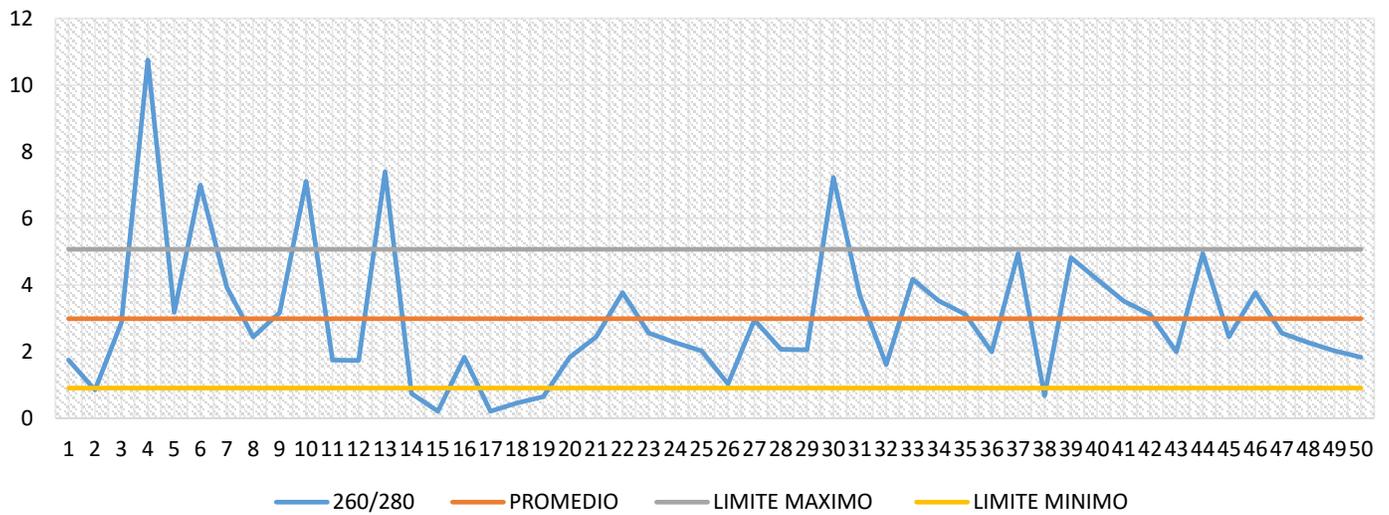


Gráfico 1 Desviación Estándar de la relación 260/280 para muestras de sangre

Desviación Estandar ng/μL(muestras de sangre)

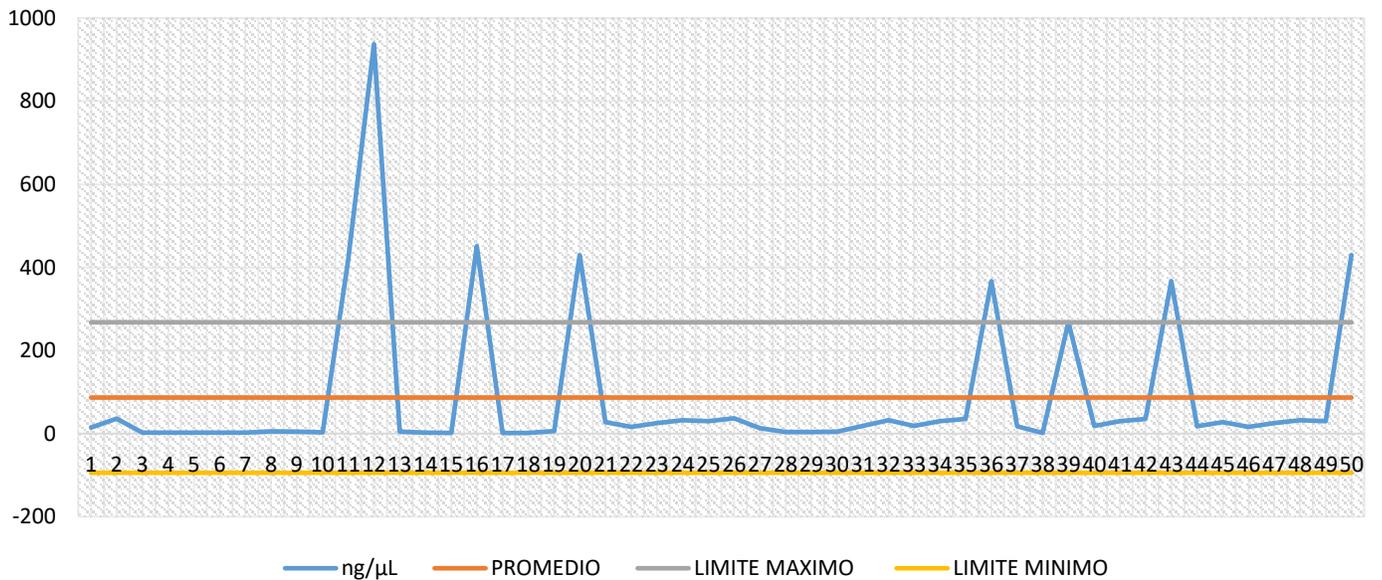


Gráfico 2 Desviación Estándar de las concentraciones (ng/μL) para muestras de sangre

Tabla 8 Lecturas de los parámetros de concentración y Abs 260/280 de DNA obtenido a partir de muestras de saliva

Sample ID	Abs260	Abs280	260/280	Con(ng/ul)
1s	0.572	0.333	1.72	28.6
2s	18.155	9.645	1.88	907.8
3s	0.653	0.314	2.08	32.6
4s	18.845	9.76	1.93	942.2
5s	16.57	8.5	1.95	828.5
6s	5.392	2.825	1.91	269.6
7s	5.53	2.996	1.85	276.5
8s	5.69	3.119	1.82	284.5
9s	10.17	5.505	1.85	508.5
10s	15.31	8.42	1.82	765.5
11s	0.845	0.409	2.07	42.3
12s	7.42	3.968	1.87	371
13s	19.2	8.45	2.2	865.8
14s	8.9	3.2	2.78	328.7
15s	16.78	8.93	1.87	745.02
16s	50.2	29.02	1.72	489.3
17s	57.76	30.89	1.86	311.7
18s	18.45	10.4	1.77	209.8
19s	27.9	15.45	1.8	370.8
20s	24.28	13.9	1.751	1214
21s	56.45	31.08	1.8	2802.2
22s	54.18	28.785	1.88	2709
23s	28.02	14.98	1.86	1401
24s	5.49	2.8	1.82	200.45
25s	77.9	43.035	1.81	3895
26s	49.83	25.97	1.92	2491.5
27s	81.715	43.36	1.88	4085.7
28s	107.88	60.14	1.79	5394
29s	41.94	22.525	1.86	2096.5

30s	38.61	20.665	1.87	1930.5
31s	101.7	53.44	1.89	5053.5
32s	77.3	33.035	2.33	1895
33s	97.88	50.14	1.95	4394
34s	30.8	18.6	1.65	987.65
35s	10.9	4.3	2.53	104.8
36s	44.3	23.67	1.86	711
37s	20.1	16.82	1.19	487.87
38s	68.6	48.03	1.42	528.7
39s	9.88	5.78	1.7	90.1
40s	18.78	9.76	1.92	942.2
41s	16.57	4.89	3.38	828.5
42s	5.392	2.825	1.91	269.6
43s	5.98	2.996	2	276.5
44s	5.69	2.998	1.89	284.5
45s	11.78	6.34	1.85	508.79
46s	15.31	9.27	1.82	765.5
47s	46.45	21.08	2.2	1802.7
48s	64.18	48.785	1.31	4709
49s	18.02	10.45	1.77	1201
50s	39.8	27.5	1.44	500.45

Tabla 9 Estadística descriptiva de los parámetros del DNA obtenido de las muestras de saliva. Programa estadístico GraphPad Prism.

Parámetro Estadístico	Relación 260/280	[DNA] ng/μL
Media	1.840	1263
Valor Mínimo	0.2000	28.60
Valor Máximo	3.380	5394
Mediana	1.860	755.3
Desviación Estándar (SD)	0.4287	1429
Coficiente de Variación (CV)	7.95%	0.002%

Desviación Estándar 260/280 (muestras saliva)

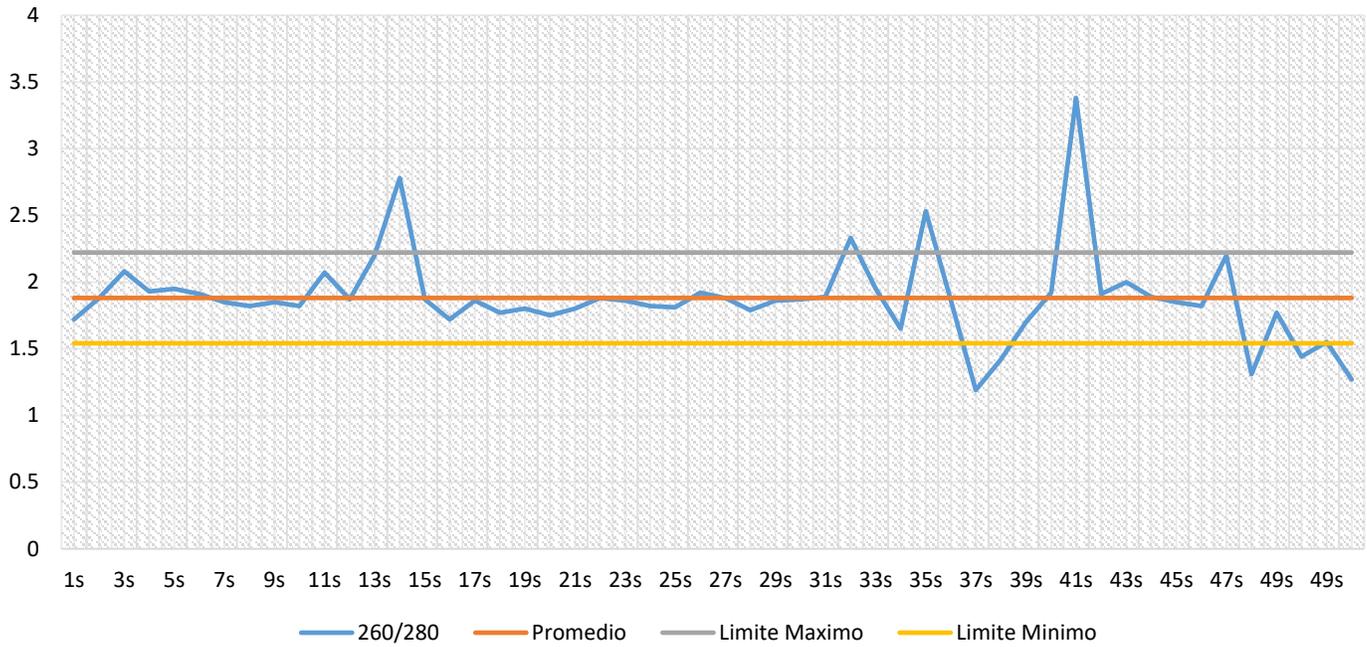


Gráfico 3 Desviación Estándar de la relación 260/280 para muestras de saliva

Desviación Estándar ng/μL (muestras de saliva)

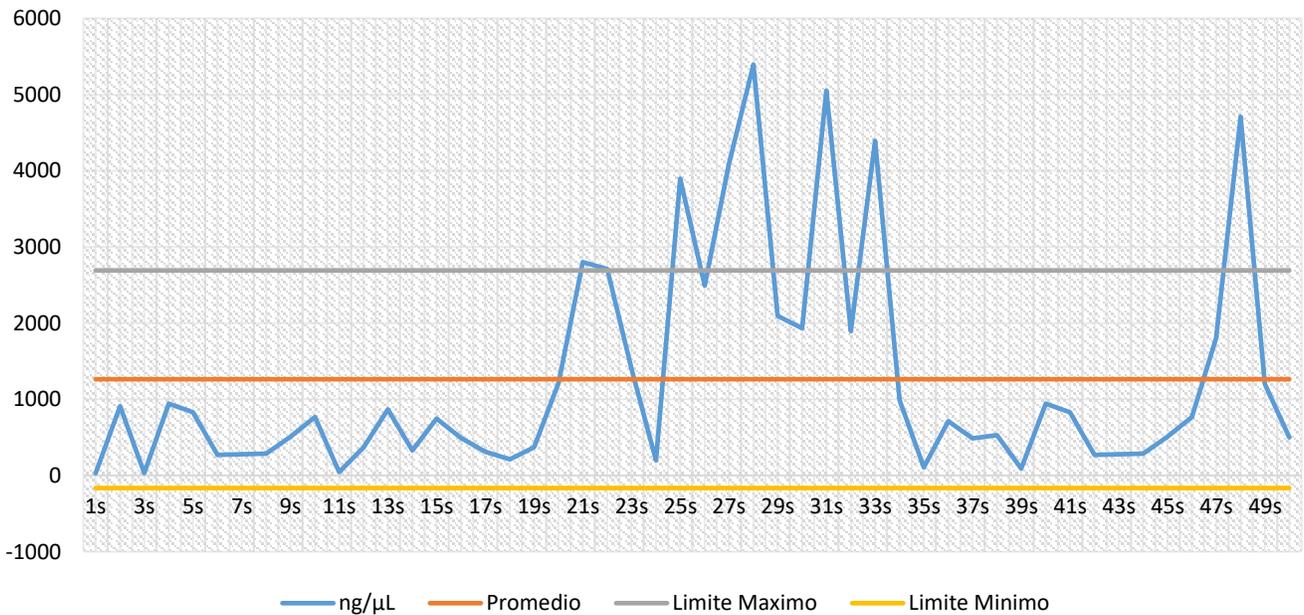


Gráfico 4. Desviación Estándar de la concentración ng/μL para muestras de saliva

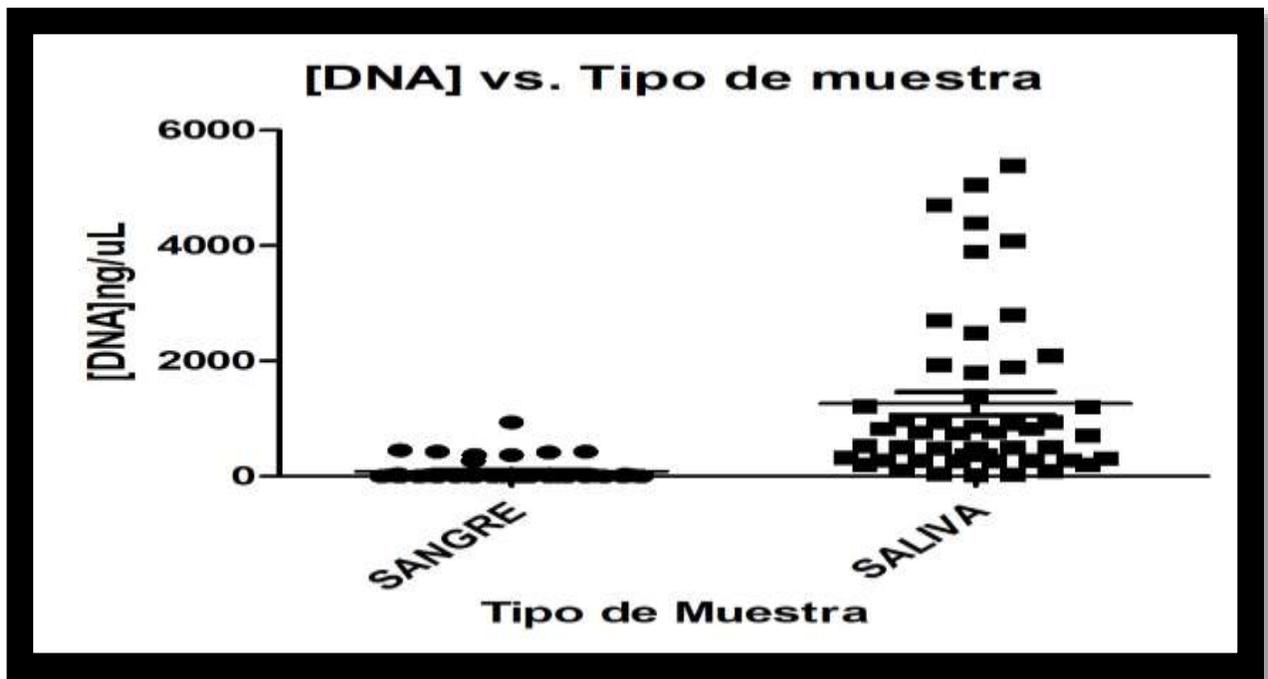


Gráfico 5 Concentración del DNA extraído (ng/ μ L) de muestras de sangre y saliva. La prueba de t mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestra ($p < 0.01$).

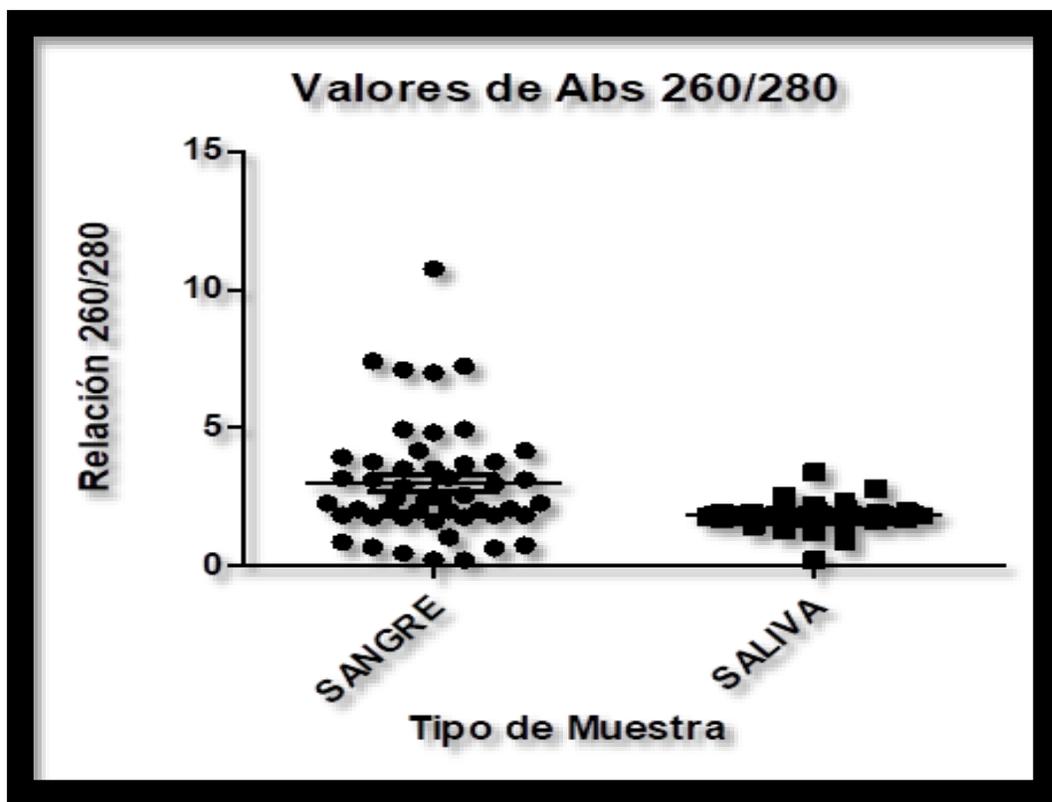


Gráfico 6 Comparación de la relación 260/280 de DNA en muestras de sangre y saliva. La prueba de t mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestra ($p < 0.01$).

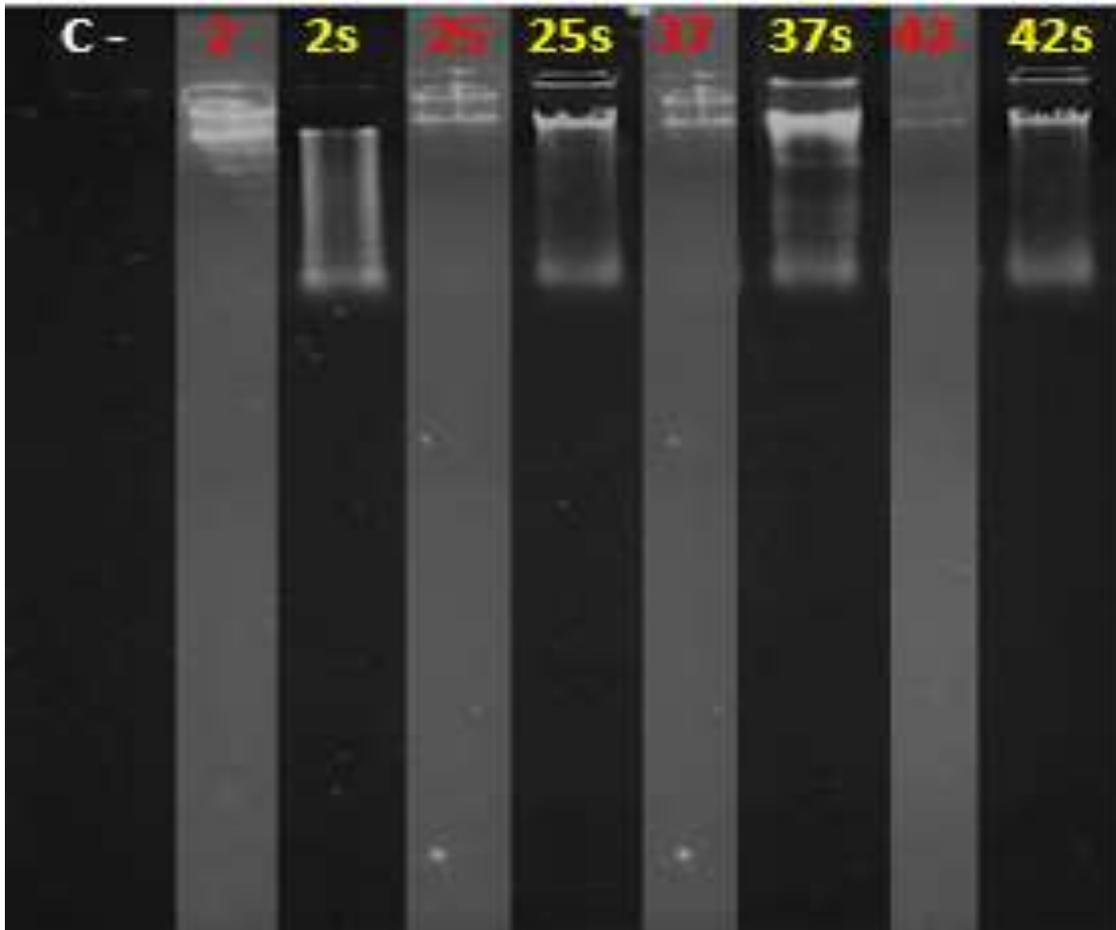


Figura 7. Comparación de la integridad de DNA en gel de agarosa al 0.5 %

Donde:

C- (Control negativo)

2 muestra de sangre y **2s** muestra de saliva y así respectivamente.

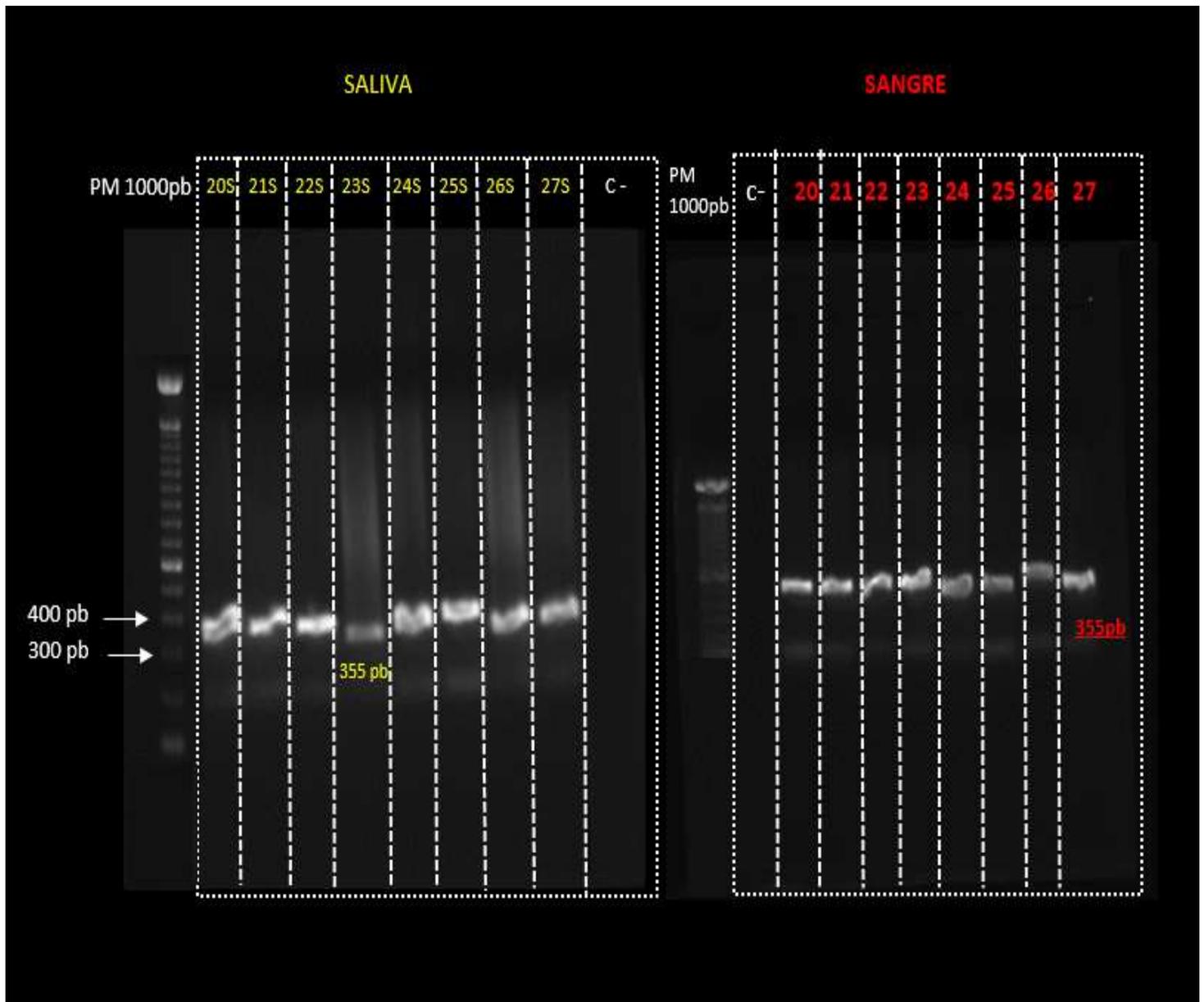


Figura 8. Producto amplificado de PCR para muestras de sangre y de saliva en gel de agarosa al 1%.

Donde:

Pm= Marcador de Peso Molecular

C- = Control Negativo de PCR

Carril 20 s a 27 s = Corrimiento de Muestras de saliva

Carril 20 a 27 = Corrimiento de Muestras de sangre

Tamaño de Amplicon esperado 355 pb

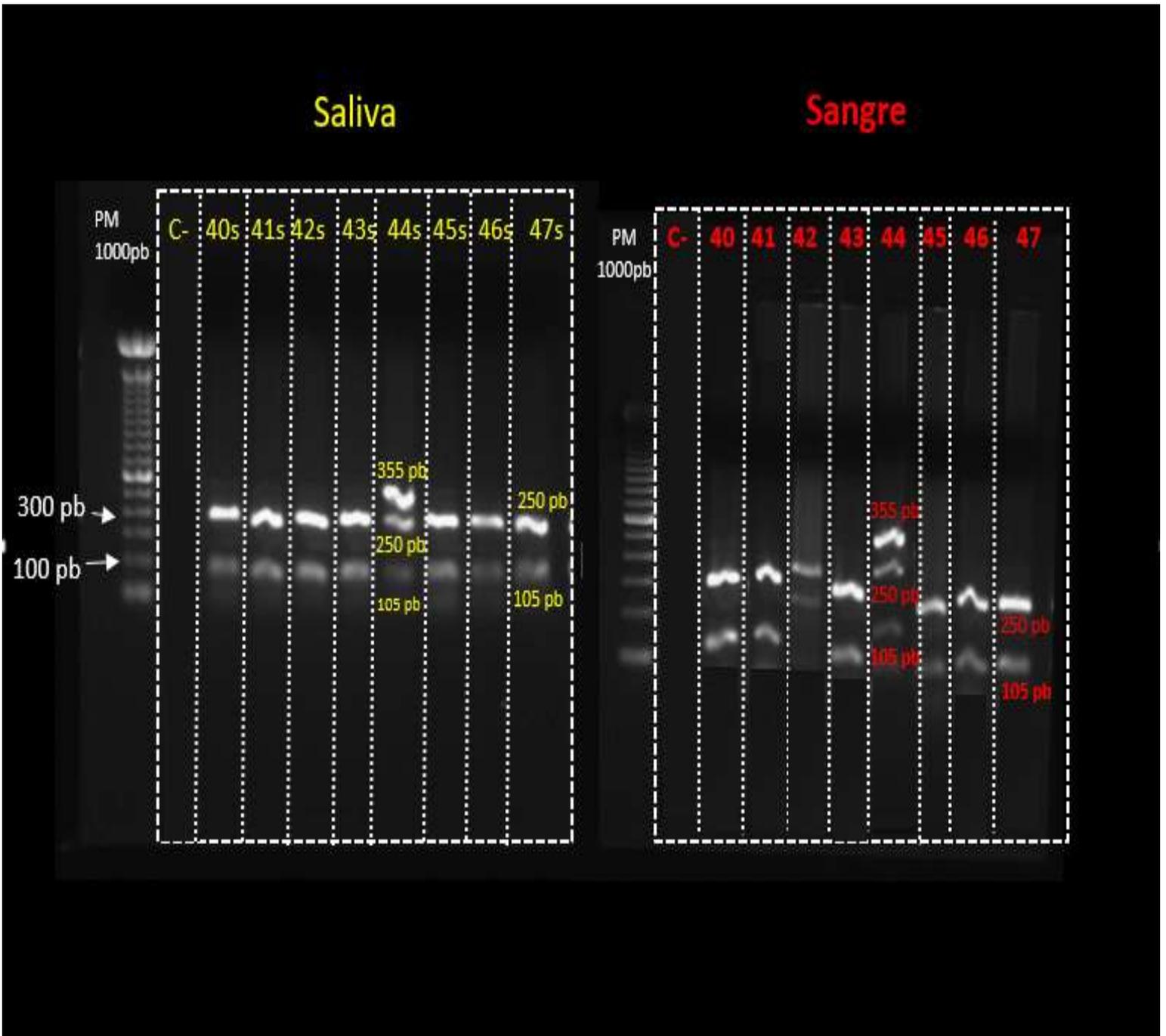


Figura 9 Producto de la Restricción Enzimática con MvaI en gel de agarosa al 1.5%

Donde:

Pm= Marcador de Peso Molecular

C- = Control Negativo de PCR

Carril 40 s a 47 s = Muestras de saliva

Carril 40 a 47 = Muestras de sangre

Tabla 10 Resultados de Genotipos para muestras de sangre.

ID MUESTRA	GENOTIPO	FENOTIPO	ID MUESTRA	GENOTIPO	FENOTIPO
1	*1/*1	MN	27	*1/*1	MN
2	*1/*1	MN	28	*1/*1	MN
3	*1/*1	MN	29	*1/*1	MN
4	*1/*1	MN	30	*1/*1	MN
5	*1/*1	MN	32	*1/*1	MN
6	*1/*1	MN	32	*1/*1	MN
7	*1/*1	MN	33	*1/*1	MN
8	*1/*1	MN	34	*1/*1	MN
9	*1/*1	MN	35	*1/*1	MN
10	*1/*1	MN	36	*1/*1	MN
11	*1/*1	MN	37	*1/*1	MN
12	*1/*1	MN	38	*1/*1	MN
13	*1/*1	MN	39	*1/*1	MN
14	*1/*1	MN	40	*1/*1	MN
15	*1/*1	MN	41	*1/*1	MN
16	*1/*1	MN	42	*1/*1	MN
17	*1/*1	MN	43	*1/*1	MN
18	*1/*1	MN	44	*1/*4	MP
19	*1/*1	MN	45	*1/*1	MN
20	*1/*1	MN	46	*1/*1	MN
21	*1/*1	MN	47	*1/*1	MN
22	*1/*1	MN	48	*1/*1	MN
23	*1/*1	MN	49	*1/*1	MN
24	*1/*1	MN	50	*1/*1	MN
25	*1/*1	MN			
26	*1/*1	MN			

Donde:
***1/*1 (CYP2D6*1 /CYP2D6*1) = Metabolizador Normal= MN**
***1/*4 (CYP2D6*1/CYP2D6*4) = Metabolizador Pobre= MP**

Tabla 11 Resultados de Genotipos para muestras de saliva.

ID MUESTRA	GENOTIPO	FENOTIPO	ID MUESTRA	GENOTIPO	FENOTIPO
1S	*1/*1	MN	26s	*1/*1	MN
2S	*1/*1	MN	27S	*1/*1	MN
3S	*1/*1	MN	28S	*1/*1	MN
4S	*1/*1	MN	29S	*1/*1	MN
5S	*1/*1	MN	30S	*1/*1	MN
6S	*1/*1	MN	31S	*1/*1	MN
7S	*1/*1	MN	32S	*1/*1	MN
8S	*1/*1	MN	33S	*1/*1	MN
9S	*1/*1	MN	34S	*1/*1	MN
10S	*1/*1	MN	35S	*1/*1	MN
11S	*1/*1	MN	36S	*1/*1	MN
12S	*1/*1	MN	37S	*1/*1	MN
13S	*1/*1	MN	38S	*1/*1	MN
14S	*1/*1	MN	39S	*1/*1	MN
15S	*1/*1	MN	40S	*1/*1	MN
16S	*1/*1	MN	41S	*1/*1	MN
17S	*1/*1	MN	42S	*1/*1	MN
18S	*1/*1	MN	43S	*1/*1	MN
19S	*1/*1	MN	44S	*1/*4	MP
20S	*1/*1	MN	45S	*1/*1	MN
21S	*1/*1	MN	46S	*1/*1	MN
22S	*1/*1	MN	47S	*1/*1	MN
23S	*1/*1	MN	48S	*1/*1	MN
24S	*1/*1	MN	49S	*1/*1	MN
25S	*1/*1	MN	50S	*1/*1	MN

Donde:

***1/*1 (CYP2D6*1 /CYP2D6*1) = Metabolizador Normal= MN**

***1/*4 (CYP2D6*1/CYP2D6*4) = Metabolizador Pobre= MP**

Tabla 12 Fenotipo y Genotipo para CYP2D6*4 (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

Genotipo	Fenotipo		Tamaño de producto después de Digestión Enzimática con Mval
Homocigoto Silvestre	Metabolizador Normal	*1/*1	250 , 105 pb
Heterocigoto	Metabolizador Intermedio	*1/*4	355,250,105 pb
Homocigoto Anormal	Metabolizador Pobre	*4/*4	355 pb

12.0 Análisis de Resultados

Para poder realizar el análisis correcto del polimorfismo de CYP2D6*4, se debe contar con una muestra de DNA problema en óptimas condiciones, las cuales nos permita someter esta muestra a los adecuados procedimientos para lograr una genotipificación verídica.

Dicho lo anterior, uno de los objetivos de la presente tesis fue demostrar la eficacia de extracción de DNA genómico a partir de muestras de saliva, teniendo en comparación el análisis de este polimorfismo a partir de una muestra de sangre. La sangre es un producto biológico de los más utilizados para cualquier estudio clínico y genómico sin embargo, con el avance de la tecnología para un diagnóstico genómico se ha demostrado que cualquier tipo de tejido o muestra biológica es óptima para el estudio genómico, obviamente dependiendo de la finalidad del estudio.

12.1 Obtención de Muestra Biológica Primaria

En cuanto a la obtención de la muestra biológica primaria se comprobó que la extracción de sangre genera dolor leve pero que en ocasiones el temor de los pacientes hacia la posibilidad de generar molestias posteriores como un hematoma. Existe el **síncope vasovagal** el cual es provocado por la fobia a sangre o a las jeringas, el cual el 98% de hombres padecen (Galvez, 2010).

A partir de las dificultades que se pueden llegar a presentar para la obtención de muestras sanguíneas, es que actualmente se está optando por la extracción de DNA a partir de muestras de saliva que llevan en sí, las células de descamación del epitelio bucal (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Uno de los grandes beneficios de utilizar saliva como muestra biológica primaria es la facilidad de obtención, ya que al terminar con el proceso de salivación, el paciente no presenta molestia alguna, ni presente y no se ha reportado ninguna posterior.

Sin embargo, de igual forma es importante mencionar algunas desventajas que se presentaron durante la obtención de saliva como muestra biológica primaria. Consideramos que el más importante es el conflicto de no poder salivar que presentaron algunos sujetos.

EL humano puede llegar a generar aprox. 2.5 L de saliva al día. En la literatura se reporta que la cantidad de salivación generada por cada persona depende de distintos factores como la alimentación, estado nutricional y salud bucal, está demostrado que pacientes que presentan poca salivación se debe principalmente a un estado de deshidratación por lo tanto al no tener la cantidad suficiente de agua en el cuerpo no se generan grandes cantidades de saliva. De aquí que ciertas enfermedades podrían predisponer a la incapacidad de salivación (Koolman, 2009).

En el caso del presente trabajo, solo 3 sujetos presentaron dificultad para salivar y poder recolectar la muestra de saliva, sin embargo, esto se facilitó pidiéndoles que pensarán en comida o inclusive viendo imágenes de comida de su agrado, ya que al ver dichas imágenes se manda una señal eléctrica al cerebro en la cual se envían impulsos a las glándulas salivales para estimularlas y poder generar cierta cantidad de saliva.

Otro método por el cual se puede facilitar la salivación es mediante movimiento circulares de la boca, simulando el movimiento que se realiza cuando se ingieren alimentos (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Si bien es conocido que las muestras de sangre son las más utilizadas para la obtención de DNA, en la actualidad los estudios genómicos la mayor parte de ellos se realiza con muestra de saliva como muestra primaria biológica.

Para poder evaluar qué tipo de muestra es la óptima o equivalente para el uso en estudios genómicos se deben de considerar los siguientes puntos:

- Calidad
- Funcionalidad
- Estabilidad
- Accesibilidad

Teniendo en cuenta estos puntos es necesario determinar cada uno de estos para muestras de sangre y muestras de saliva (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

12.1.1 Calidad, Funcionalidad, Estabilidad y Accesibilidad

La calidad de las muestras se refiere a que tan óptima es nuestra muestra primaria biológica para poder realizar un estudio genómico y poder llegar al resultado deseado; que en el caso del presente trabajo fue la genotipificación del alelo *4 de CYP2D6. Este punto se evalúa con la cuantificación del DNA extraído tanto para muestras de sangre y muestras de saliva tal y como se muestra en las tablas **6** y **8** (Griffiths & Miller, 2012).

De igual forma un punto importante para evaluar la calidad del DNA obtenido es a partir de la visualización del DNA mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 0.5% bajo las condiciones ya mencionadas en la metodología.

Como resultado de este corrimiento electroforético se obtuvo la **Figura 7** con ayuda del editor de imágenes Smartview Pro-1100 del Fotodocumentador se logró editar un gel donde se pueda apreciar la comparación de muestras del mismo paciente, es decir muestras de sangre y saliva. La comparación del corrimiento electroforético se realizó para las 50 muestras de DNA. Para fines prácticos del presente trabajo, se muestra el corrimiento de las muestras 2-2s, 25-25s, 37-37s, 42-42s, las cuales fueron seleccionadas para la comparación de forma aleatoria.

En las muestras de DNA a partir de muestras de sangre se logra apreciar una banda la cual tienen un intensidad de fluorescencia menor en comparación con las muestras de saliva, esto se relaciona con la lectura de la concentración de DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) ya que entre mayor sea la cantidad de DNA mayor el grado de fluorescencia.

Así que las lecturas de DNA **concuerdan** con lo que se observa en el gel de agarosa.

Una gran diferencia que se observa en este corrimiento es que las muestras de saliva presentan un barrido al final de la muestra, se descarta una posible contaminación de la muestra ya que uno de los parámetros para identificar la pureza de una muestra de DNA es la relación 260/280 la cual se abordará más adelante en el presente trabajo y se demuestra que no se trata de una contaminación puesto que la relación 260/280 para estas muestras de saliva está en el rango permisible aceptable de pureza para una muestra de DNA.

Este barrido consideramos que se debe a una gran cantidad de proteínas salivales que se encuentran en la saliva tales como la amilasa.

Las cuales con los lavados durante la extracción de DNA no fue suficiente para lisarlas por completo y precipitarlas con los compuestos fenólicos utilizados en la extracción (Griffiths & Miller, 2012).

Cuando se trata de material genómico, el DNA obtenido a partir de saliva debe rendir en la misma medida que lo hace el obtenido a partir de una muestra de sangre. ¿Dónde está la diferencia? En las enzimas y/o bacterias naturalmente presentes en la saliva, que pueden alterar y degradar ese material genético.

Para evitar este problema, existen kits específicos (DNA saliva collection kits) que incluyen preservantes para mantener intacta la integridad del ADN.

Existen diversos estudios que demuestran que el DNA extraído a partir de saliva arroja resultados equivalentes al obtenido en muestras de sangre en técnicas como PCR, SNP, genotipado, microarrays y NGS.

Este Kit contiene una solución concentradora de células epiteliales y de descamación de la mucosa oral lo cual nos garantiza obtener una cantidad aceptable de DNA y una pureza dentro del rango analítico permisible. (Cozza & Armstrong , 2001) (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Una de las marcas más utilizadas de este Kit de recolección es de la casa comercial DNA Orange Genotek[®], en el cual para su validación y poder salir al mercado comercial se realizaron pruebas de comparación de extracción de DNA entre muestras de sangre y saliva, reportando resultados favorables para la extracción de DNA a partir de saliva en comparación con las muestras de sangre. La casa comercial reporta que su Kit de extracción permite lisar la mayor parte de proteínas salivales en un 70% lo cual refleja un rango bastante aceptable para la pureza e integridad de una muestra de DNA

En comparación con el presente trabajo no se utilizó ningún kit de recolección de muestra lo cual nos permite justificar la presencia de proteínas las cuales no se lograron desnaturalizar para que de esta forma se precipitaran y se eliminaran.

La funcionabilidad la pudimos evaluar mediante la genotipificación, este punto va ligado con la calidad de la muestra puesto que si no se cuenta con una buena calidad de DNA no se logrará tener una funcionalidad analítica.

La estabilidad de la muestra no es un punto que se halla evaluado dentro de este trabajo de tesis sin embargo, al revisar la literatura y el inserto para el kit de recolección de saliva DNA Orange Genotek[®], esto nos expresa que existe una diferencia en cuestión de tiempo de preservación de muestras de sangre y saliva siendo las muestras de saliva las más estables, manteniendo su calidad de DNA hasta por 7 años a temperatura ambiente de 20 a 25 grados centígrados. Mientras que las muestras de DNA extraídas de sangre tienen una estabilidad más corta de 3 a 4 años en temperaturas bajo cero en estado de congelación, esto debido a los componentes orgánicos de cada tipo de muestra.

La accesibilidad de una muestra se refiere a que tan fácil se tiene el acceso a esto, es decir que tipo tiene el menor número de complicaciones para su recolección, lo cual en el presente trabajo se logra demostrar que la obtención de muestras de saliva es de mayor accesibilidad (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015).

En la parte Clínica y experimental de igual forma es de mayor accesibilidad puesto que cuando los pacientes son pediátricos, geriátricos o presentan alguna discapacidad, la recolección de saliva se facilita no ejerciendo ningún procedimiento invasivo al paciente que puede llegar a causar algún conflicto físico o emocional.

Si bien está demostrado que a partir de muestras de sangre se obtiene una buena cantidad y calidad de DNA, en el presente trabajo se demuestra que trabajando con muestras de saliva se obtiene de igual forma una muestra que cumple con los 4 puntos básicos para una muestra biológica primaria.

Siguiendo la metodología de extracción de DNA *de Covarrubias modificada de Buffone y Darlington; Millar y Polesky; Maniatis y Fritsh* (Miller, Dykes, & Polesky, 1988), se logró extraer DNA a partir de muestras de sangre y saliva obteniendo los resultados que se presentan en las tabla **6 y 8**, en las cuales se expresan los valores de concentración en ng/ μ L la Absorbancia a 260 nm y 280 nm , así como la relación de estas dos absorbancias, se presenta la tabla de valores para cada una de las muestras recordando que son muestras del mismo sujeto de estudio ; es decir la muestra 1 (sangre) y 1s (Saliva) corresponden a la misma persona.

Uno de los puntos de calidad más importantes (**GOLD STANDARD**) para determinar si el DNA obtenido es óptimo para su estudio se basa en el análisis entre la lectura de la concentración (ng/ μ L) y la relación de la absorbancia 260/280.

Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de DNA basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. De este modo la concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

La relación A260/280 es muy estable y se considera que un DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un DNA de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6.

Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Un valor A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos (Hart & Jones, 2010).

No obstante, la relación 260/280 se puede llegar a afectar mediante factores como la concentración de DNA o de la composición del tampón de re suspensión de la muestra. (Griffiths & Miller, 2012).

12.2 Análisis Estadístico para resultados de muestras de sangre y saliva

Teniendo en cuenta lo anterior es importante realizar el análisis estadístico descriptivo para cada tipo de muestras, este estudio estadístico se basa en el cálculo de la Media, la Desviación Estándar (SD) y de esta forma poder calcular el Coeficiente de Variación (CV) tanto para la relación 260/280 como para la concentración de DNA ng/ μ l los cuales se encuentran en las **tablas 7 y 9**.

12.2.1 Media calculada para concentraciones ng/ μ L. para muestras de sangre y saliva

La media calculada para la concentración (ng/ μ L) en muestras de **sangre** es de **86.8438 ng/ μ L**. Esto quiere decir que el promedio de la concentración de las 50 muestras de sangre oscila en los 86.84 ng/ μ L., mientras que para muestras de **saliva** la media es de **1356.27 ng/ μ L**.

Analizando estos resultados podemos determinar que las muestras de saliva presentan una mayor concentración (ng/ μ L), en el Grafico 5 se realiza la comparación de las concentraciones obtenidas en nuestras 2 diferentes poblaciones, muestras DNA a partir de sangre y saliva , en la cual se observa considerablemente la distribución de concentraciones es mayor en muestras de saliva.

La literatura reporta que en muestras de saliva se logra obtener una concentración de DNA en promedio de 600 a 800 ng/ μ L, esto debido a que en la saliva se encuentran más células de descamación de la mucosa oral, pero estas a su vez vienen acompañadas con proteínas que son componentes de la saliva, las cuales pueden llegar a interferir con estudios genómicos o afectar directamente en la integridad de la muestra. Este punto se analizará más adelante con la ayuda de la relación 260 /280.

En diferentes estudios se ha discutido la importancia de la concentración de DNA obtenido a partir de muestras biológicas, y con esto nos lleva a la importancia de la calidad del DNA obtenido. No por el hecho de obtener una concentración elevada en la lectura de DNA esto quiere decir que es una muestra de alta calidad (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Como se puede apreciar en la tabla **7 y 9** la media para cada una de la muestra biológica primaria es diferente y hay una significancia de importancia para cada una, Una de las preguntas planteadas para esta parte es ¿Por qué existe una diferencia significativa en concentraciones de muestras de saliva y de sangre?

La respuesta se basa en la naturaleza de la muestra biológica primaria utilizada, como ya se mencionó la sangre cuenta principalmente con dos tipos celulares los eritrocitos y los leucocitos. El DNA se obtiene a partir de la lisis de los leucocitos ya que los eritrocitos pierden su núcleo durante su maduración por lo cual no se puede extraer DNA.

Para muestras de saliva se extrae a partir de la lisis de las células epiteliales de descamación de la mucosa oral.

Ambos tipos Celulares son lisados con un agente químico (TTS). En la homogeneización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en presencia de detergentes, y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular y de esta forma liberar el material genómico después de un proceso de purificación (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas

Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación.

En cuanto a la lectura en concentraciones podemos observar que estas varían de forma significativa teniendo valores desde 2.3 ng/ μL hasta 419 ng/ μL , según la literatura la obtención de DNA a partir de muestras de sangre entera puede variar por diferentes variantes incluyendo la calidad de la técnica de extracción así como la calidad de los reactivos a utilizar y las condiciones en las cuales la extracción se llevó a cabo (Hart & Jones, 2010).

En cuanto a muestras de sangre durante la metodología se puede observar que se necesitan un mayor número de lavados con TTS para poder retirar los restos de eritrocitos y hemoglobina y de esta forma lisar los leucocitos y poder obtener la mayor cantidad de DNA.

Mientras que con muestras de saliva son menores los números de lavados para poder desechar los restos de proteínas, bacterias y restos de alimentos para de esta forma lisar las células epiteliales de la mucosa oral.

Con los resultados obtenidos en cuanto a concentraciones ng/ μL se demuestra que la lisis de las células para cada una de las muestras se logra, teniendo un mayor rendimiento en muestras de saliva puesto que la lisis de la membrana de células epiteliales de descamación es más fácil de romper y liberar el DNA.

12.2.2 Media calculada de la relación 260/280 para muestras de sangre y saliva

La relación 260/280 como ya se mencionó, es un parámetro que permite determinar la calidad de la muestra de DNA, a partir de las lecturas obtenidas para cada una de las muestras se calculó la media de esta relación para muestras de sangre y saliva (**tabla 7 y 9**).

Para muestras de sangre se obtuvo una media de 2.988 para la relación 260/280 y para muestras de saliva una media de 1.88. El cálculo de la media nos permite determinar cual es el valor en el que oscilan las lecturas para

cada una de las 50 muestras y de esta forma determinar de forma general el rendimiento y la calidad de un grupo de muestras de DNA.

La media poblacional calculada de la relación 260 /280 para muestras de sangre es > a 2.98 lo cual nos indica la presencia de RNA en estas muestras, lo cual no es un buen indicio para la calidad de muestras a pesar de que presenten una buena concentración de DNA.

12.2.3 Coeficiente de Variación (CV) calculado para relación 260/280 y Concentración (ng/μL.)

El CV se define como la medida de dispersión de los datos, para las muestras de sangre se obtuvo un CV del 0.0069% para la relación (260/280), y para la concentración ng/μL un CV de 0.0208%.

Para muestras de saliva se obtuvo un CV de 7.95% para la relación (260/280) y para la concentración ng/μL un CV de 0.0208%.

En el caso de las muestras de sangre encontramos un CV bajo tanto para la relación 260/280 como para la concentración, esto nos quiere decir que el tamaño de dispersión de estas dos variantes no es tan significativa, lo cual nos indica que presentan valores homogéneos a pesar de que las muestras se tratan de diferentes sujetos de estudio. Esto nos habla de una reproductibilidad buena del método para esta población, esto no indica una buena calidad de muestras de DNA a partir de muestras de sangre

Para muestras de saliva obtenemos un CV más amplio lo cual nos indica que existen diferencias significativas en las lecturas de DNA, a pesar de que se trata de la misma naturaleza de la muestra biológica y muestra del mismo sujeto de estudio, lo cual nos indica que para esta población de muestras de saliva la reproductibilidad del método es baja.

Con lo cual comprobamos que en muestras de saliva encontramos más factores que influyen al momento de realizar la extracción de DNA.

A pesar que se mantuvo un estándar de exclusión para poder elegir a los sujetos que participarían en el presente estudio encontramos que existen factores que alteran la reproductibilidad del método, estos factores se basan en puntos como, salud bucal, el grado de hidratación y la viscosidad de la muestra de saliva obtenida

La salud bucal es un factor que altera el grado de homogeneidad del método puesto que personas que no tienen una buena higiene bucal presentan mayor cantidad de microbiota, por lo cual afecta la concentración y la relación 260/280 para las muestras de pacientes con una higiene bucal no adecuada, pueden llegar a necesitar una mayor cantidad de lavados y un método de purificación para poder eliminar el mayor grado de restos bacteriano y de esta forma no afectar el estudio genómico (Francini, Thomas, & Thiago, 2010).

El grado de hidratación es otro punto importante el cual afecta el grado de dispersión entre los puntos para muestras de saliva. Ya que la cantidad de saliva producida por una persona se ve directamente relacionada con el grado de hidratación del cuerpo, entre mejor hidratado este la persona mayor será la cantidad de saliva producida y con esto mayor será la cantidad de células epiteliales presentes en la muestra de saliva y mayor podrá ser la concentración de DNA obtenido.

Estos factores son los que impactan directamente en el CV calculado tanto para relación 260/280 como para la concentración de muestras de saliva, lo cual afecta el grado de reproducibilidad del método.

12.2.4 Cálculo de desviaciones estándar (SD) para la relación 260/280 y concentraciones ng/μL

Una vez calculados los valores de estadística descriptiva se logró realizar gráficos en relación a la Desviación Estándar tanto para la relación 260/280 (**Grafico 1 y 3**) como para la concentración ng/μL (**Grafico 2 y 5**) para muestras de sangre y de saliva

La desviación estándar es un índice numérico de la dispersión de un conjunto de datos (o población). Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión de la población, de igual forma La desviación estándar es considerada como un promedio de las desviaciones individuales de cada observación con respecto a la media de una distribución.

Para muestras de sangre se obtuvo un valor de SD de 2.0907 (260/280) y 181.05 (ng/μL), para muestras de saliva se obtuvo un valor de SD de 1496.64 (260/280) y 0.3403 (ng/μL).

Calculado el SD para cada una de la muestras podemos observar de nuevo la diferencia tan significativa que tienen las muestras entre sí.

Analizando los gráficos de SD para la relación 260/280 para muestras de sangre (**Grafico 1**) y muestras de saliva (**Gráfico.3**), podemos observar el índice de dispersión de estos valores de SD, Las muestras de sangre presentan un menor valor de SD, sin embargo como esta SD está dada por la media poblacional obtenida se observa una dispersión mayor para cada una de la muestras, esto nos refleja que la relación 260/280 para muestras de sangre es variable entre ellas, esto se debe a las lecturas de 260/280 no son las más satisfactorias puesto que presentan en general un valor aceptable, sin embargo esto no nos refleja una calidad tan alta en comparación con las muestras de saliva.

En cuanto a las muestras de saliva podemos apreciar en el **Gráfico.3** como los puntos no muestran un grado significativo de diferencia entre sí, esto de igual forma se ve reflejado en la media calculada para la relación 260/280 la cual es un valor aceptable y de alta calidad puesto que no se muestra contaminación por RNA o proteínas que afecten la integridad del DNA.

Realizando la comparación de estos índices estadísticos (SD) comprobamos una vez más que las muestras de saliva presentan un grado menor de variabilidad con respecto a la media calculada para la relación 260/280, por lo tanto la calidad de muestras de DNA extraídas de saliva fresca es mayor en comparación a las muestras de sangre.

En cuanto al cálculo de SD para la concentración (ng/ μ L), se obtiene un valor relativamente bajo para muestras de sangre y un valor alto para muestras de saliva.

Esto nos refleja una vez más el grado de variabilidad que tienen las muestras de DNA, mientras que en el **Gráfico 2** podemos apreciar un grado de variabilidad menor en las concentraciones (ng/ μ L) para muestras de sangre, en el **Gráfico .4** se observa una variabilidad mayor entre los puntos, esto lo comprobamos de igual forma con el valor calculado de SD para muestras de sangre y saliva.

La SD para muestras de saliva no arroja una diferencia significativa en cuanto a las concentraciones (ng/ μ L), esto de igual forma no afecta en cuanto a la calidad de muestra para poder someterla a un proceso de genotipificación.

Este grado alto de diferencia entre los puntos se lograría disminuir de manera significativa con un método comercial para la recolección y extracción de muestras de saliva, como ya se mencionó con anterioridad este Kit comercial permite tener un proceso más estandarizado para la obtención de muestras de DNA a partir de muestras de saliva.

Esta diferencia se ve directamente afectada por los factores ya antes mencionados que alteran la concentración de células epiteliales de descamación encontradas en saliva fresca.

12.3 Obtención de producto de PCR

Una vez obtenida la muestra de DNA a partir de una muestra primaria, posterior al análisis de integridad de estas muestras de DNA estas son sometidas a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para poder obtener un producto y este producto obtenido ser sometido a una restricción enzimática y poder tener una detección óptima del polimorfismo 4 de CYP2 D6.

Antes de llevar a cabo la reacción PCR se analizaron las concentraciones de DNA de cada una de las muestras, esto gracias a que en la literatura se reporta que concentraciones muy elevadas entre los 1500 ng/ μ L y concentraciones de 3000ng / μ L, pueden llegar a realizar una inhibición en la PCR.

Esta inhibición es considerada como uno de los mayores problemas analíticos para que una PCR se considere exitosa, principalmente se debe a que concentraciones altas del material genético realizan una competencia por los dNTPs y el alineamiento con la secuencia a amplificar no es la correcta (Hart & Jones, 2010).

Por lo cual en el presente trabajo fue necesario manejar una concentración máxima de 1000 ng/ μ L, por lo que aquellas muestras que presentan una concentración por arriba de este límite se realizó una dilución 1: 5, para poder homogenizar las concentraciones y de esta forma poder asegurar la amplificación de nuestro producto de PCR. Esto se realizó principalmente en la extracción de DNA a partir de saliva fresca ya que como pudo observarse en la tabla se obtenían comúnmente concentraciones más elevadas que en sangre.

Otra de las problemáticas que se presentan durante el diseño de una PCR es la concentración de los PRIMERS. Una concentración baja del PRIMER específico debido a la alta degeneración, esto puede ser corregido fácilmente aumentando la concentración del primer y evitando una inhibición competitiva (Bertilsson , Dahl , Dalen , & Al-Shurbaji, 2002).

Es de suma importancia conocer los PRIMERS a utilizar, como ya se sabe el diseño de PRIMER específicos para una secuencia determina es de suma importancia y radica como un punto vital para una PCR.

Para el presente proyecto no fue necesario diseñar los PRIMERS puesto que una comercializadora ya contaba con el diseño de estos para la amplificación específica de la región de interés, sin embargo uno de los retos a los que se enfrenta un analista al momento de recibir los PRIMERS es determinar a qué concentración se van a utilizar, de igual forma esto se realizó con anterioridad al presente proyecto de tesis, la concentración óptima de los PRIMERS está en un rango de 0.1 a 1.0 mM. , en una concentración más baja a la óptima, el producto de la amplificación puede ser pobre. Por otra parte, en una concentración más alta, el alineamiento no específico puede superar la amplificación del producto deseado.

Las concentraciones del PRIMER se pueden fijar dependiendo de las características y las cantidades de DNA. Bajas concentraciones de PRIMER se recomiendan para DNA altamente complejos, tal como DNA genómico humano o para altas concentraciones de DNA templado. Mientras que altas concentraciones se prefieren para templados de poca complejidad tales como DNA de plásmido, o para cantidades limitadas de DNA templado (Griffiths & Miller, 2012).

En el anexo A se puede consultar la ficha técnica que proporciona la comercializadora para el uso de los PRIMERS , la cual cuenta con información técnica como TM y %GC que son puntos estratégicos para considerar el uso de los mismos en la parte experimental.

De igual forma la concentración óptima del magnesio se puede afectar por las características y propiedades de la mezcla de reacción, incluyendo concentraciones de dNTPs, de los PRIMERS y los agentes quelantes que contenga el templado. El exceso de Mg^{2+} tiende a causar productos no específicos que se observan como un

barrido de bandas en el gel, mientras que el Mg^{2+} escaso puede generar menos productos amplificados (Menoyo , Del Rio, & Baiget , 2006).

La PCR se llevó a cabo en un Termociclador Eppendorf el cual es un instrumento que nos permite elevar y disminuir la temperatura específica para que la reacción de la Polimerasa se lleva a cabo. En el marco teórico del presente trabajo se aborda de forma más específica cada una de las etapas y a que temperatura se lleva a cabo cada ciclo de reacción.

Para poder determinar el polimorfismo de CYP2D6 * 4 se llevó a cabo la reacción bajo condiciones específicas las cuales se mencionan en la Metodología del proyecto.

Otra de las limitantes que se pueden presentar para determinar si una PCR es exitosa o no es la Contaminación de nuestros reactivos de PCR, esta contaminación se puede llevar a cabo al momento de manipular los reactivos de forma errónea y no poner en práctica las buenas prácticas de Laboratorio, por lo cual es importante considerar un Control Negativo de PCR para llevar a cabo su amplificación , lo cual nos garantiza que los reactivos a utilizar presentan una calidad extraordinaria para poder someter nuestras muestras de DNA a la PCR. (Miller, Dykes, & Polesky, 1988).

12.3.1 Evaluación del producto de PCR

Una vez realizada la PCR el Producto generado se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % utilizando Gel Red como colorante fluorescente para poder visualizar el tamaño de nuestro producto de amplificación y poder determinar si el producto observado corresponde al esperado para realizar la detección del polimorfismo. Las condiciones de la electroforesis se mencionan en la Metodología del presente trabajo.

Para la detección de este polimorfismo se utilizó el método Schur y colaboradores , amplificando una región que abarca la unión entre el intron 3 y el exon 4 , la cual contiene un cambio de guanina por adenina, realizando luego una digestión del producto de PCR.

La PCR se llevó a cabo utilizando las secuencias FORWARD (5' a 3') y REVERSE (3' a 5') de los PRIMERS las cuales se pueden consultar en el anexo A del presente trabajo.

El protocolo de PCR consta de un paso inicial 94°C 5' (desnaturalización) [94°C 1'-----60°C 1'-----72°C 1.5]30 ciclos 72°C 10'-----4°C (indefinido).

Una vez finalizada la PCR se espera obtener un producto de 355 pb, esto se realizó para cada una de las 50 muestras, es decir 50 muestras de sangre y 50 muestras de saliva. Por fines prácticos en la presente Tesis se decidió colocar solamente una imagen de la evaluación de los productos de PCR de muestras al azar.

En este caso analizaremos *la Figura 8* la cual corresponde al corrimiento electroforético de las muestras 20 a 27, respectivamente a muestras de saliva (20s -27s) y de sangre, para el corrimiento electroforético se utilizó un Marcador de peso Molecular de 1000 pb para poder visualizar el tamaño de nuestro producto amplificado obtenido, y el corrimiento de un Control negativo para garantizar que nuestra PCR se realizó de forma adecuada como ya antes se mencionó.

Podemos observar que se logró con éxito la PCR puesto que para cada una de las muestras se obtuvo un producto de 355 pb lo cual es el tamaño del producto que se esperaba, sin importar el origen de la muestra primaria (Saliva o Sangre), lo cual nos indica que se puede someter este producto amplificado a una digestión enzimática para poder determinar la presencia de un polimorfismo en este alelo.

Sin embargo, como se puede apreciar en la *Figura 8*, la banda del producto presenta una curvatura inusual lo cual se podría interpretar como que el tamaño de la banda no es el correcto ni el adecuado. Investigando en diferentes fuentes bibliográficas se reporta que este fenómeno se debe a que la concentración del Buffer de Corrimiento en este caso TBE 1x no es el mismo con el cual se preparó el gel de Agarosa, por lo cual la concentración es diferente y afecta en el corrimiento de nuestro producto.

Una recomendación que se presenta en diferentes artículos es preparar el buffer el mismo día que se utilizara en el corrimiento electroforético y con este mismo prepara el gel de agarosa y de ser posible no reutilizar ese buffer de corrimiento puesto que con el uso y al ser sometido a voltajes y temperatura este puede llegar a perder su estabilidad y funcionalidad para un corrimiento óptimo, Sin embargo como se mencionó esto es una recomendación por parte de diferentes autores, lo cual no significa que no se pueda llegar a reutilizar en algún otro corrimiento electroforético (Hart & Jones, 2010) (Cozza & Armstrong , 2001) (Linder, Prough , & Valdes , 2007).

En la parte experimental no se utilizó el mismo buffer para preparar el gel y el usado para el corrimiento, por lo cual justifica el fenómeno que podemos observar.

A pesar de esta curvatura no se presenta algún otro indicador que pueda darnos un falso positivo o que el tamaño de la banda se ponga en duda.

No se observa diferencia alguna en cuanto a la intensidad del producto detectado en muestras de saliva y sangre, lo cual nos indica que no se presenta ninguna limitante o algún tipo de inhibición en la PCR para la detección del polimorfismo en una muestra u otra , lo cual es parte de los objetivos de la presente tesis.

12.4 Caracterización de polimorfismo mediante restricción con enzima Mva1

El polimorfismo 4 de CYP2D6, es uno de los polimorfismos más estudiados, pues tiene una implicación clínica, puesto que este produce una actividad nula para la enzima metabolizadora de fármacos, cuyas dianas terapéuticas son del Sistema Nervioso Central (Colombres García, 2008).

Los pacientes que presentan el polimorfismo, su dosis de fármacos tiene que ser monitoreada y modificada, de tal forma que el tratamiento sea adecuado para cada paciente lo cual cumple uno de los objetivos de la farmacogenómica (Bernard, Kevin, & Nguyen, 2006).

Para poder llegar a este resultado de fenotipos y para poder establecer qué tipo de metabolizador es cada paciente, es necesario realizar una digestión enzimática sobre el producto de PCR obtenido.

Una vez evaluado el producto de amplificación por PCR, se sometieron los productos a una digestión enzimática con la enzima Mva1 (*Micrococcus varians*), la cual nos proporciona un patrón de bandas (patrón de restricción) que permitirá la caracterización del polimorfismo 4 para CYP2D6 **Figura 6**.

Las enzimas de restricción son enzimas que cortan DNA, cada enzima reconoce una o un número pequeño de secuencias blanco y corta el DNA en o cerca de estas secuencias.

Los individuos homocigotos para el genotipo silvestre (*1/*1) generan dos segmentos de tamaño 250 y 105 pb; los homocigotos del polimorfismo (*4/*4) no modifican el segmento de 355 pb y genotipo heterocigoto (*1/*4) produjo los fragmentos de 355, 250 y 105 pb (Hanioka, Kimura, Meyer, & Gonzalez, 2015).

El alelo CYP2D6*4 presenta un cambio de base de Guanina por Adenina en la posición 1846 que lleva a un codón de término prematuro, que se traduce en una proteína no funcional, lo cual nos indica que la actividad enzimática es nula para poder metabolizar fármacos con lo cual nos da un fenotipo como metabolizador nulo (Cozza & Armstrong, 2001).

Se realizó un corrimiento electroforético a los productos de digestión enzimática (**Figura 9**) para cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, se hace una comparación de la digestión enzimática para cada una de las muestras, tanto de sangre como saliva, teniendo en cuenta que al igual que en la PCR se manejó un Control negativo, con la finalidad de garantizar la calidad de la restricción y poder evidenciar que los reactivos utilizados para esta digestión no presentan ningún tipo de contaminación que nos pueda dar falsos positivos o generar algún tipo de banda que se pueda confundir con una banda que origina la restricción enzimática.

Para poder genotipificar a cada individuo es necesario conocer cuáles son los posibles fenotipos que se pueden obtener para CYP2D6*4 y de esta forma poder dar un resultado al paciente y poder dar una dosificación personalizada para mejor resultado en el tratamiento.

En las **Tablas 10 y 11** se encuentran los resultados obtenidos de genotipos para cada uno de las muestras tanto sangre como saliva, en la **Figura 9** podemos observar una comparación entre muestras de saliva y sangre para confirmar que el resultado del genotipo en base a la restricción enzimática, este genotipo se determina a partir del tamaño de bandas que se observa después de la digestión enzimática.

Cada una de las muestras fue analizada después de la digestión enzimática, determinando el genotipo de cada una con el tamaño de producto de digestión que se observa.

En la **Tabla 12** podemos observar el genotipo y el fenotipo que corresponde dependiendo del tamaño de las bandas que se observan posterior a la digestión enzimática.

Todas las muestras fueron sometidas a un análisis y por lo tanto una comparación del resultado de la restricción enzimática, obteniendo un 100 % de concordancia entre muestras de sangre y muestras de saliva del mismo sujeto de estudio.

Todas las muestras estudiadas presentaron un genotipo homocigoto silvestre de CYP2D6 dando como resultado dos bandas posteriores a la digestión enzimática una de 250 y una de 105 pb, lo cual nos da como resultado fenotípico un Metabolizador Normal , lo cual quiere decir que no se presenta algún daño en las enzimas metabolizadoras de CYP2D6 , las cuales son encargadas principalmente de metabolizar fármacos que su acción terapéutica va dirigido al Sistema Nervioso Central, estos fármacos con más utilizados para tratamientos psiquiátricos, de ahí la importancia de determinar estos polimorfismos, con lo cual nos lleva a una dosificación del fármaco adecuada para cada paciente con la finalidad de lograr una terapia efectiva para cada patología (Meijerman, Sanderson , Smits, & Beijnen, 2007).

Solo el sujeto de estudio con ID 44 y 44s resultó tener un genotipo heterocigoto (*1/*4) lo cual nos da como fenotipo un Metabolizador Intermedio, esto quiere decir que presenta un alelo con el polimorfismo 4 para CYP2D6, esto no compromete por completo la actividad enzimática para metabolizar los fármacos. Sin embargo, el paciente presentará un tiempo más prolongado para poder metabolizarlos, por lo tanto los metabolitos generados tardan más tiempo en localizar la diana terapéutica.

Podemos observar que este mismo resultado es para muestras de saliva y de sangre con lo cual una vez más se demuestra la eficacia de usar muestras de saliva fresca como fuente de DNA primario para poder realizar el estudio genómico y poder reducir las complicaciones y molestias que genera la toma de muestras sanguíneas para los pacientes.

De igual forma la calidad y funcionalidad de la muestra se comprueba llegando al resultado obtenido para la detección del polimorfismo 4 de CYP2D6, el estudio comparativo de los resultados no arroja diferencia alguna

entre muestras de saliva y muestras de sangre, es decir el mismo genotipo obtenido de muestra de sangre de un paciente es el mismo en la muestra de saliva.

En el caso del sujeto de estudio de la muestra identificada como 44 y 44 s, dentro de la clínica es de gran utilidad la detección del polimorfismo de los pacientes con actividad enzimática intermedia, ya que con base a este diagnóstico el médico tratante, puede determinar la dosis terapéutica adecuada para el paciente, con lo cual una vez más se pretende cumplir uno de los puntos de la triada de la Farmacogenómica la cual es poder tener una medicina personalizada (Lynch & Price , 2007).

Diferentes estudios han propuesto la detección de polimorfismos para CYP2D6 dentro del sector salud para que de esta forma el tratamiento a pacientes sea individualizado y con base a su estudio genómico, lo cual sería de gran impacto para la industria farmacéutica de igual forma en el sector salud puesto que con la determinación de polimorfismos de enzimas metabolizadoras la tasa de éxito para tratamientos farmacológicos aumentaría en un 80 % de los casos (Cozza & Armstrong , 2001) (Colombres García, 2008).

Estudios realizados en población mexicana arrojan que el 3.2 % de la población presenta el polimorfismo 4 para CYP2D6 (Casas, Zavaleta, & Izaguirre, 2015). Es por eso la importancia de mejorar en alguno de los pasos las técnicas para el genotipificado y en el caso del presente estudio se puso de manifiesto que la opción de saliva como muestra de origen del DNA fue una muy buena opción.

13. Conclusiones

- ✓ Se comprobó la viabilidad de la detección del polimorfismo 4 de CYP2D6 en muestras de saliva, esto gracias a la comparación de los resultados obtenidos para poder determinar el fenotipo de cada sujeto de estudio.
- ✓ Se estandarizó la técnica de extracción de DNA a partir de muestras de saliva y se demostró la eficiencia, calidad y funcionalidad del material obtenido a partir de este método.
- ✓ Muestras de saliva presenta un mejor rendimiento en relación 260 /280 y concentraciones de DNA, en comparación a muestras de sangre, para este protocolo.
- ✓ Mediante la extracción de DNA se determinó el fenotipo y genotipo para CYP2D6*4 de cada uno de los sujetos de estudio, teniendo 100% de concordancia en los resultados de sangre y saliva.
- ✓ Se propició un impacto ambiental positivo , ya que los residuos de muestra biológica y material son menores en la extracción de DNA a partir de saliva en comparación de sangre
- ✓ Se determinó que ningún componente de la salival afectó la determinación del polimorfismo *4 de CYP2D6

14. Perspectivas del Proyecto

- ✓ Reproducir el estudio de otros polimorfismos enzimáticos de CYP450 realizando la extracción de DNA a partir de muestra de saliva fresca, para que de esta forma se apliquen las ventajas mencionadas en este trabajo y se confirme la utilidad, efectividad, calidad y funcionalidad de este método.
- ✓ Realizar el mismo protocolo con un mayor número de muestras, para tener un mayor impacto poblacional, para que de esta forma se pueda realizar la genotipificación de una población más amplia y poder obtener frecuencias genotípicas para los polimorfismos de CYP2D6.
- ✓ Determinar un rango de concentraciones en muestras de DNA para muestras de saliva, y de esta forma obtener bandas más claras en las electroforesis.

Anexo A

1.1 Preparación de soluciones

Extracción TTS

- Sacarosa (109.6 g)
- Tris (10 mL)
- Tritón X -100
- NaCl 5mM
- SDS
- NaCl (saturado)
- Cloroformo / Alcohol Isoamilico
- Etanol Absoluto Frio

Electroforesis

- ✓ TRIS 12.1 g para 1000 ml de solución
- ✓ Ácido Bórico 5.5 g para 1000 mL de solución
- ✓ EDTA 0.93 g para 1000 mL de solución

NOTA: Disolver TRIS en el 60 % del volumen total

PCR

- Oligo Forward 1000 ng/μL
- Oligo Reverse 1000 ng/μL
- Agua Libre de Nucleasas
- Master Mix
- DMSO

Restricción Enzimática

- ❖ Producto de PCR 10μL
- ❖ Enzima Mval 0.2 μL
- ❖ Buffer 10 x R 2μL
- ❖ H₂O Inyectable 7.8

1.2 Carta de consentimiento informado



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán

Cuautitlán Edo, México a _____ del _____

Por medio de la presente yo _____ hago constar que he sido informado y se han aclarado todas mis preguntas respecto al uso que se le dará a las muestras donadas para el proyecto de tesis **“Comparación de muestras biológicas para la detección de polimorfismo de CYP2D6”**, la cual se desarrollará en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán en el laboratorio de citogenética con domicilio en Ave. 1o de Mayo S/N, Santa María las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, Mex. Bajo la asesoría de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo** y el manejo de las muestras y los resultados queda bajo la responsabilidad del pasante de Lic. En Bioquímica Diagnóstica **Soriano Salas Luis Gerardo**.

Sin perjuicio de los procedimientos que se realizarán declaro tener plena capacidad, conciencia y lucidez para decidir y aceptar el procedimiento de Toma de muestra sanguínea y de saliva fresca bajo mi completa responsabilidad.

Nombre y firma del donador

p.BQD Luis Gerardo Soriano Salas

1.3 Ficha Técnica de Primer (Reverse)



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

04-Sep-2014

Order No. **10624590**

Ref. No. **125302476**

Sequence - CYP4R

100 nmole DNA Oligo, 20 bases

5'- AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 57.4 °C
 GC Content: 55.0%
 Molecular Weight: 6,053
 nmoles/OD260: 5.5
 µg/OD260: 33.3
 Ext. Coefficient: 181,700 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

2.5 = 13.7 = 0.08
 OD260 nMoles mg

Shipped To

VERONICA LOPEZ
 UNIPARTS, S.A. DE C.V.
 GALILEO 92, POLANCO
 D.F.,
 MEXICO
 52814718
 Customer No. 252667 PO No. 14830

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.91 at 25 °C
 Strongest Folding *T_m*: 35.0 °C
 Secondary structure should not affect yield or purity for this oligo.

Oligo Base Types

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	20

Modifications and Services

Modifications and Services	Quantity
HPLC Purification	1

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID 177155822

Labels - Peel Here



I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

M

1.4 Ficha Técnica de Primer (Forward)



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

04-Sep-2014

Order No. **10624590**

Ref. No. **125302475**

Sequence - CYP4F

100 nmole DNA Oligo, 19 bases

5'- GCC TTC GCC AAC CAC TCC G -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 61.7 °C
 GC Content: 68.4%
 Molecular Weight: 5,669.7
 nmoles/OD260: 6.1
 ug/OD260: 34.7
 Ext. Coefficient: 163,600 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

1.9 = 11.4 = 0.06
 OD260 nMoles mg

Shipped To

VERONICA LOPEZ
 UNIPARTS, S.A. DE C.V.
 GALILEO 92, POLANCO
 D.F.,
 MEXICO
 52814718
 Customer No. 252667 PO No. 14830

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.39 at 25 °C
 Strongest Folding *T_m*: 16.8 °C
 Secondary structure should not affect yield or purity for this oligo.

Oligo Base Types

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	19

Modifications and Services

Modifications and Services	Quantity
HPLC Purification	1

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID177155821

Labels - Peel Here



I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

M

1.5 Corolario

En la actualidad en México son pocos los lugares donde se realiza investigación farmacogenómica, o que se practican estos tipos de estudios a pacientes para poder lograr un tratamiento personalizado.

La industria farmacéutica en México se verá beneficiada directamente en sus protocolos de investigación de nuevos fármacos, si a cada paciente dentro del protocolo se le realiza un estudio de polimorfismo para saber si su genoma presenta alguna anomalía para la actividad enzimática y de esta forma conocer el fenotipo de cada uno de los pacientes, la dosificación sería adecuada para cada uno de ellos y de esta forma el gasto económico en tratamientos fallidos disminuirá y beneficiará a la industria y claro está a cada uno de los pacientes.

El sector salud en México muchas veces no cuenta con el presupuesto adecuado para tratar a los millones de personas que se encuentran con algún tipo de patología y lamentablemente muchas veces no se tiene acceso a un tratamiento terapéutico, peor aún si además el paciente presenta alguna alteración genética que afecte la farmacocinética o farmacodinamia del medicamento prescrito y por lo tanto el tratamiento no sea el adecuado debido a una mala dosificación.

Países de primer mundo cuentan con estudios Farmacogenómicos como herramienta principal para el tratamiento y seguimiento principalmente en graves patologías como el cáncer y todo esto se logra con proyectos de investigación, los cuales se realizan con base al genoma de sus pobladores.

Sin duda alguna la Farmacogenómica es el ***“Puente hacia el Futuro”*** tal y como lo menciona uno de los fundadores de esta rama de las ciencias Ómicas, la cual día a día supera las expectativas y logra cumplir con cada uno de sus objetivos para el bienestar del ser humano (Gutiérrez , 2004).

Referencias

- abyntek. (26 de Marzo de 2018). *Abyntek*. Obtenido de <http://www.abyntek.com/extraccion-de-adn-a-partir-de-saliva/>
- Awise, J. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates.
- Belloso , W., & Redal, M. (2010). La Farmacogenómica y el camino hacia la medicina personalizada. *Medicina*, 70(3), 265-274.
- Bernard, S., Kevin, N., & Nguyen, A. (2006). Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. *The Oncologist*, 11(4), 126-135.
- Bertilsson , L., Dahl , M., Dalen , P., & Al-Shurbaji, A. (2002). Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 69, 111-122.
- Casas, Zavaleta, A., & H.Izaguirre, V. (2015). Molecular Bases of the main CYP2D6 gene genetic polymorphism ethnic differences and pharmacological consequences. *Ciencia e investigación*, 4, 60-70.
- Cascorbi, I. (2003). Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 33, 17-22.
- Colombres García, S. (2008). Variabilidad en la respuesta a fármacos debido a polimorfismos en enzimas de la familia CYP450. *Farmacología y Genoma*, 8, 889-904.
- Cozza, K., & Armstrong , S. (2001). *The Cytochrome P450 System. Drug Interaction Principles for Medical Practice*. Washington DC: American Psychiatric Publishing.
- Dooley, M., & Hogan, S. (2003). Environmental epidemiology and risk factors for autoimmune disease. *Drugs Metabolism Review*, 9, 7-15.
- Eichelbaum , M., & Burk, O. (2001). CYP3A genetics in drug metabolism. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 116, 183-187.
- Evans, W. (2013). Pharmacogenomics : marshalling the human genome to individualize drug therapy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 34(2), 67-79.
- Evans, W., & Mcleod , H. (2014). Pharmacogenomics — Drug disposition, drug targets, and side effects. *The New England Journal of Medicine*, 348, 538-549.
- Francini, G. T., Thomas, B., & Thiago, J. (2010). Human DNA extraction from whole saliva. *Journal of Applied Oral Science*, 67(3), 25-32.
- Frye, R. (2010). Probing the world of cytochrome P450 enzymes. *Molecular Interventions*, 4, 157-162.
- Galvez, I. (2010). *Bases de la Fisiología* (2 ed.). Barcelona: Tebar.
- Garlang, K. (2008). *Genomics ans Structure*. Médica Panamericana.
- Gonzalez , F. (2016). *Human cytochrome P450 , problems and prospect*.
- Gonzalez, S., Cristiano, E., & Arbigay, P. (2014). *Epigenética y Epigenoma :Un paso más allá en la etiología y potencial tratamiento de las enfermedades neurológicas*.
- Griffiths, A., & Miller, H. (2012). An Introduction to Genetic Analysis. *Drugs Metabolism Review*, 5, 56-67.
- Gutiérrez , R. (2004). Farmacogenética: medicina personalizada. *Revista Cubana de Farmacia*, 38, 1-7.

- Hanioka, N., Kimura, S., Meyer, U., & Gonzalez, F. (2015). The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: A G1934→A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *The American Journal of Human Genetics*, 47, 994-1001.
- Hart, D., & Jones, E. (2010). *Genetics: analysis of genes and genomes*. Jones and Bartlett.
- Hidalgo Pérez, J. (2015). Antecedentes de la era genómica. *UPAEP*, 30-35.
- Higgins, M., & Stearns, V. (2010). CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen metabolism: clinical relevance. *Current Oncology Reports* 12, 7-15.
- Ingelman-Sundberg, M. (2015). Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metabolism and Disposition* 29, 570-573.
- Kitagawa, K., Kunugita, N., Katoh, T., Yang, M., & Kawamoto, T. (2016). The significance of the homozygous CYP2A6 genotyping method using a single PCR-RFLP. *FEBS Letters*, 392, 30-34.
- Koch, W. (2014). Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 749-761.
- Koolman, B. (2009). *Bioquímica Texto y Atlas* (3 ed.). Médica Panamericana.
- Licio, J., & Wong, M. (2008). Pharmacogenomics- The search for Individualized Therapies. *Drug Metabolism Reviews*, 39, 45-60.
- Linder, M., Prough, R., & Valdes, R. (2007). Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clinical Chemistry* 143, 254-266.
- Lovlie, R., Daly, A., Molven, A., Idle, J., & Steen, V. (2017). Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Letters* 392, 30-34.
- Lynch, T., & Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician* 76, 391-396.
- McCarthy, L., & Davies, K. (2002). Pharmacogenetics in diverse ethnic populations, implications for drug discovery and development. *Pharmacogenomics Reviews*, 38, 89-120.
- Meijerman, I., Sanderson, L., Smits, P., & Beijnen, J. (2007). Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. *Drug Metabolism Reviews* 39, 49.
- Menoyo, A., Del Rio, E., & Baiget, M. (2006). Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochemistry and Function*, 24, 381-385.
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1212-1220.
- Minaguchi, K., & Bennick, A. (2014). *Genetics of human Salivary*. Washington Dc: Biol Chem.
- Pierce. (2003). *Genética, un enfoque conceptual* (3.- ed.). Médica Panamericana.
- Ruiz Bernal, M., & Herrero Alcalde, A. (14 de Agosto de 2015). La era de las ciencias ómicas. *Farmacia del Reino de Aragón*, 9, 64.
- Ruiz, O. (2012). *Genética Médica* (2 ed.). Universidad de Barcelona.

- Shi MM, B. M. (2001). Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. *Drug Metabolism Review*, 5, 48-60.
- Soberon, X., & Bolivar, F. (2009). Gen y Genoma. *Investigación Interdisciplinaria de Ciencias y Humanidades*, 18, 4-16.
- Solari, A. J. (2013). *Genética humana "Fundamentos y aplicaciones en medicina"*. Buenos Aires, A, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Stratchan, T., & Read, A. (1999). *Human molecular genetics*. John Wiley & Sons.
- University, S. (05 de noviembre de 2017). *pharmgkb*. Obtenido de <https://www.pharmgkb.org/>
- Zavaleta, P., Izaguirre, A., & Lopez, V. (2011). Bases Moleculares de los principales polimorfismos del gen CYP2D6, diferencias etnicas y consecuencias farmacologicas. *Farmacologia Chilena*, 8, 9-13.