



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *CYP2D6* BASADO EN AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN”

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ARGENIS FERNANDO ÁLVAREZ GUERRERO

DIRIGIDA POR

DR. RUBÉN LÓPEZ REVILLA

SINODALES

DR. RUBÉN LÓPEZ REVILLA
DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
ASESOR INTERNO

M.I.M. DAVID GUSTAVO GARCIA GUTIÉRREZ
SINODAL

M. en C. GUILLERMO PETTET RUIZ
SINODAL



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN
CYP2D6 BASADO EN AMPLIFICACIÓN POR PCR Y
SECUENCIACIÓN

por

Argenis Fernando Álvarez Guerrero

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-211426



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *CYP2D6* BASADO EN AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ARGENIS FERNANDO ÁLVAREZ GUERRERO

DIRIGIDA POR

DR. RUBÉN LÓPEZ REVILLA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *CYP2D6* BASADO EN AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN”

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ARGENIS FERNANDO ÁLVAREZ GUERRERO

DIRIGIDA POR

DR. RUBÉN LÓPEZ REVILLA

SINODALES

DR. RUBÉN LÓPEZ REVILLA
DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
ASESOR INTERNO

M.I.M. DAVID GUSTAVO GARCIA GUTIÉRREZ
SINODAL

M. en C. GUILLERMO PETTET RUIZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. ANTECEDENTES	1
I.1 Depresión	1
I.2 Clasificación de los trastornos depresivos	3
I.3 Trastorno depresivo mayor	3
I.4 Tratamiento	4
I.5 Venlafaxina	5
I.6 El gen <i>CYP2D6</i>	6
I.7 Polimorfismos de nucleótido único (SNPs)	6
I.8 Polimorfismos del gen <i>CYP2D6</i>	7
I.9 Farmacogenética	11
II. HIPÓTESIS	12
III. OBJETIVOS	13
III.1 General	13
III.2 Específicos	13
IV. METODOLOGÍA	14
IV.1 Materiales	14

IV.1.1 Aparatos/instrumentos	14
IV.1.2 Materiales	14
IV.1.3 Reactivos	15
IV.2 Métodos	16
IV.2.1 Toma de muestra y almacenamiento	16
IV.2.2 Extracción y purificación de DNA	16
IV.2.3 Determinación de la concentración de ADN y Pureza.	17
IV.2.4 Diseño de oligonucleótidos iniciadores	17
IV.2.5 Amplificación del gen <i>CYP2D6</i>	21
IV.2.6 Secuenciación	22
IV.2.7 Análisis de las secuencias	24
IV.2.8 Diseño experimental	25
V. RESULTADOS	26
V.1 Extracción y purificación del ADN	26
V.2 Amplificación del segmento <i>CYP2D6-α</i>	27
V.3 Amplificación del segmento <i>CYP2D6-β</i>	30
V.4 Amplificación del segmento <i>CYP2D6-γ</i>	33
V.5 Amplificación de los tres segmentos con ADN	35
V.6 Secuenciación	36
V.7 Alineamientos	36
V.8 Análisis de las secuencias y determinación del genotipo	37
VI. DISCUSIÓN	42
VI.1 Extracción y purificación de ADN	42
VI.2 Amplificación de los segmentos <i>CYP2D6-α</i> , <i>-β</i> y <i>-γ</i> .	42

VI.3 Análisis de las secuencias	44
VI.4 Análisis y frecuencia de los SNPs	44
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Estudios farmacológicos reportados referentes a medicamentos metabolizados por CYP2D6.	9
2. Alelos que se propone detectar con el método y SNPs que los integran.	18
3. Oligonucleótidos (primers) propuestos en este trabajo de tesis	20
4. Preparación de las soluciones madre de oligonucleótidos (100 μ M)	20
5. Gradiente de temperatura y concentración de $MgCl_2$ que se probó para la amplificación de segmentos CYP2D6- α y - γ .	21
6. Gradiente de temperatura probado para la amplificación del segmento β a una concentración de $MgCl_2$ 2 mM.	22
7. Concentración y pureza del ADN	26
8. Volúmenes de TE 1X añadidos a las muestras de ADN para ajustar la concentración a 20 ng/ μ L	27
9. Presencia de la banda CYP2D6- α (339 pb) en mezclas de PCR con $MgCl_2$ 1.5-3 mM amplificadas por 30 ciclos con temperaturas de annealing de 58.5 a 65.0 $^{\circ}$ C	28
10. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- α (339 pb) con $MgCl_2$ 1.5-3 mM y temperaturas de annealing de 58.5 a 65 $^{\circ}$ C.	29

11. Presencia de la banda CYP2D6- β (1039 pb) en mezclas de PCR con MgCl ₂ 2 mM amplificadas 30 ciclos con temperaturas de annealing de 60.5 a 67.0°C.	31
12. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- γ (1039 pb) en mezclas de PCR con MgCl ₂ 2 mM y temperaturas de annealing de 60.5 a 67.0 °C.	31
13. Presencia de la banda CYP2D6- γ (680 pb) en mezclas de PCR con MgCl ₂ 1.5-3 mM amplificadas 30 ciclos con temperaturas de annealing de 58.5 a 65.0 °C.	33
14. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- γ (680 pb) con MgCl ₂ 1.5-3 mM y temperaturas de annealing de 58.5 a 65°C.	34
15. Temperaturas de annealing y concentraciones de MgCl ₂ elegidas para amplificar los segmentos CYP2D6- α , - β y - γ por 30 ciclos.	35
16. Frecuencia de SNPs clínicamente relevantes.	38
17. Perfil de SNPs de los alelos asociados a venlafaxina.	39
18. Fenotipos metabolizadores predichos por el genotipo <i>CYP2D6</i> .	40
19. Genotipos de <i>CYP2D6</i> encontrados y fenotipos metabolizadores predichos.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Frecuencia con la que los mexicanos tienen pensamientos depresivos (Encuesta INEGI, 2017).	2
2. Defunciones por suicidio registradas en México en el periodo 1994-2016.	2
3. Metabolismo de venlafaxina.	6
4. Ejemplo de un cromatograma en el que se identifica un SNP heterócigo con dos picos de color rojo y azul en la secuencia forward (T/A) en la imagen de la izquierda y reverse (T/A) en la imagen de la derecha.	24
5. Secuencia del trabajo experimental que se realizó.	25
6. Gel de electroforesis correspondiente a las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6- α (25 μ L, 30 ciclos). El cuadro rojo señala la presencia de una banda de baja intensidad.	28
7. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- α (339 pb) en función de la concentración de MgCl ₂ y la temperatura de annealing.	29
8. Gel de electroforesis de las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6- β (25 μ L, 30 ciclos)	30
9. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- β (1039 pb) en función de la temperatura de annealing.	32
10. Electroferograma de las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6- γ (25 μ L, 30 ciclos). Los cuadros rojos señalan bandas de baja intensidad.	33

11. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- γ (680 pb) en función de la concentración de MgCl ₂ y la temperatura de annealing.	34
12. Patrón de bandeo de los segmentos CYP2D6- α (naranja), CYP2D6- β (azul) y CYP2D6- γ (verde) amplificados a partir del ADN de dos pacientes en las condiciones descritas en el cuadro 15.	35
13. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6- α .	36
14. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6- β .	37
15. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6- γ .	37
16. Gráfica de la frecuencia de SNPs clínicamente relevantes (WT = Tipo silvestre, Het = Heterocigoto, HM = Homocigoto).	39
17. Gráfica de la frecuencia (porcentaje) de genotipos de CYP2D6 encontrados.	41
18. Fenotipos de CYP2D6 (porcentaje).	41

RESUMEN

La depresión es la principal causa de discapacidad laboral que padecen unos 300 millones de personas en el mundo. El trastorno depresivo mayor (TDM), la forma más frecuente de los trastornos depresivos, se caracteriza por episodios depresivos crónicos o frecuentes y su forma más severa puede conducir al suicidio. Los pacientes con TDM son tratados con psicoterapia y medicamentos como la venlafaxina, que tiene ventajas sobre otros antidepresivos. La venlafaxina es metabolizada en gran parte por CYP2D6, enzima codificada por el gen *CYP2D6* del que hay numerosas variantes alélicas por cambios puntuales en la secuencia nucleotídica, denominados polimorfismos de nucleótido único (SNP, *single nucleotide polymorphisms*). Las variantes alélicas clínicamente relevantes del gen *CYP2D6* afectan la actividad de la enzima y el metabolismo del fármaco y pueden estar asociadas a efectos adversos que van desde mareos y vómito hasta cardiopatías o daño hepático. En este trabajo fue diseñado y validado un método para la detección de SNPs del gen *CYP2D6* basado en la amplificación y secuenciación de tres regiones génicas denominadas *CYP2D6- α* , *- β* y *- γ* , mediante el diseño de oligos específicos y la determinación de las condiciones óptimas de amplificación. La secuencia de muestras de ADN sanguíneo amplificadas de 20 sujetos fue determinada para identificar el genotipo y el fenotipo metabolizador de venlafaxina en cada individuo. El genotipo *CYP2D6*1/*41*, que determina un fenotipo metabolizador intermedio para venlafaxina, fue el predominante y se encontró en el 69.2% de los sujetos incluidos en este estudio. El método desarrollado aquí permitirá determinar el genotipo, predecir el fenotipo metabolizador y ajustar la dosis de venlafaxina en pacientes con TDM.

I. ANTECEDENTES

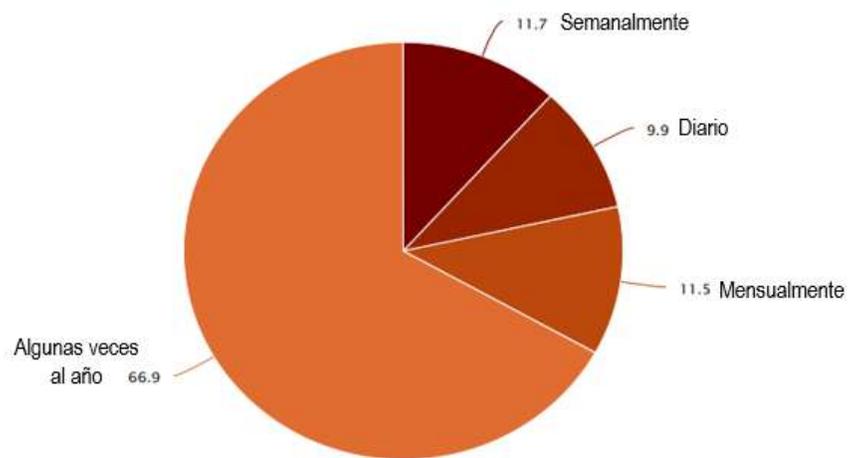
I.1 Depresión

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la depresión es un trastorno mental frecuente caracterizado por tristeza, pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración (OMS, 2017).

Esta enfermedad de impacto mundial ha tomado importancia porque se estima que afecta diversos factores determinantes de la calidad de vida de los 300 millones de personas que la padecen. La depresión es a nivel mundial la causa principal de discapacidad laboral y contribuye notablemente a la carga mundial de morbilidad general ya que en sus formas más severas puede conducir al suicidio (OMS, 2017). Se espera que en 2030 también será la causa principal de carga por enfermedad en el mundo (Martinez y col., 2017).

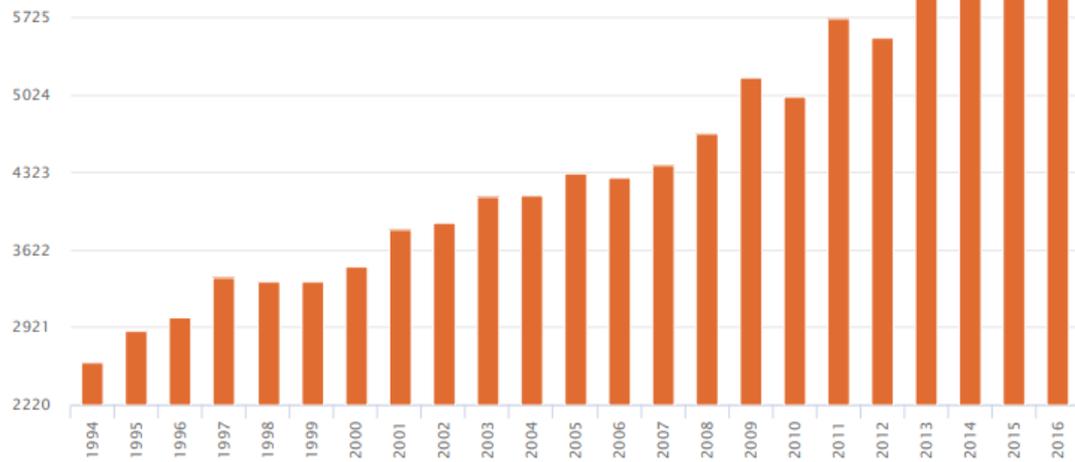
Estudios realizados entre los años de 2013 a 2017 en México por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2018) revelaron que el 9.9% de la población mexicana tiene pensamientos depresivos diariamente, mientras que el 11.9% los tiene cada semana (Figura 1).

El número de defunciones por suicidio registradas en los años 1994-2016 ha ido en aumento considerable (Figura 2); el grupo de jóvenes entre 15-29 años es uno de los más vulnerables, pues en este grupo de edad representa la segunda causa de muerte (INEGI, 2017).



Fuente:
INEGI Encuesta Nacional de los Hogares 2017.

Figura 1. Frecuencia con la que los mexicanos tienen pensamientos depresivos (Encuesta INEGI, 2017).



Fuente:
[INEGI Estadísticas de Mortalidad.](#)

Figura 2. Defunciones por suicidio registradas en México en el periodo 1994-2016.

I.2 Clasificación de los trastornos depresivos

La diferencia entre los tipos de trastornos depresivos radica en la duración, tiempo de inicio y etiología. Estos trastornos se clasifican de la siguiente manera (APA, 2013):

- Trastorno de desregulación disruptiva del estado de ánimo.
- Trastorno depresivo mayor.
- Trastorno depresivo persistente (distimia).
- Trastorno disfórico premenstrual.
- Trastorno depresivo inducido por sustancia/medicamento.
- Trastorno depresivo debido a otra afección médica.
- Trastorno depresivo específico.
- Trastorno depresivo inespecífico.

I.3 Trastorno depresivo mayor

El Trastorno Depresivo Mayor (TDM) se posiciona como la condición más frecuente en los pacientes que sufren trastornos depresivos. Se caracteriza por episodios discretos de por lo menos dos semanas de duración (aunque es común que se prolongue más tiempo) en los que se observan cambios claros en el comportamiento afectivo, la cognición y las funciones neurovegetativas, así como por periodos de remisión entre cada episodio (APA, 2013).

El TDM se presenta con el doble de frecuencia en mujeres que en hombres y afecta a uno de cada seis adultos a lo largo de su vida. La etiología del TDM es multifactorial. Se estima que la contribución hereditaria es aproximadamente del 35%. Otros factores relacionados fuertemente con el desarrollo de TDM son ciertos factores ambientales y el abuso sexual, físico o emocional durante la infancia. Hasta ahora ningún mecanismo establecido puede explicar todos los aspectos de la enfermedad. Sin embargo, el TDM se asocia con alteraciones en los volúmenes de regiones

cerebrales, en particular del hipocampo, y con cambios funcionales en los circuitos cerebrales, como la red de control cognitivo y la red de atención afectiva. Además se ha encontrado que en pacientes con TDM hay alteraciones en los principales sistemas neurobiológicos sensibles al estrés, incluidos el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal y el sistema inmunológico (Otte, 2016).

I.4 Tratamiento

El tratamiento del TDM comprende principalmente la psicoterapia profesional y el tratamiento farmacológico (Otte, 2016).

Los fármacos empleados en el tratamiento del TDM se pueden agrupar así (Linde y col., 2015):

- Antidepresivos tricíclicos (TCA).
- Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI).
- Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (SARI).
- Inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI).
- Inhibidores selectivos y antagonistas de serotonina (SARI).
- Agentes antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NaSSA).
- Inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A (rMAO-A).

Para los pacientes con resistencia al tratamiento farmacológico, es decir, que no han respondido de manera adecuada a varios intentos de aumento o combinación de tratamientos, se emplea la terapia electro-convulsiva (Otte, 2016). Este procedimiento se lleva a cabo con anestesia general y consiste en pasar pequeñas corrientes eléctricas a través del cerebro, para desencadenar una convulsión breve de manera intencional. La terapia electro-convulsiva al parecer provoca cambios en la neuroquímica cerebral que pueden revertir rápidamente los síntomas de algunas

enfermedades mentales (MFMER, 1998). Sin embargo, los riesgos y efectos secundarios pueden ser de un grave daño al paciente e inclusive tener consecuencias a largo plazo.

I.5 Venlafaxina

La venlafaxina es un inhibidor de la recaptación de serotonina – norepinefrina (SRNI) prescrito para el tratamiento de TDM, trastorno de estrés post traumático (TEPT) (Garcia y col., 2017), desorden de ansiedad generalizada, trastorno de pánico y fobia social (Cipriani y col., 2009).

Este fármaco es eliminado principalmente a través del sistema enzimático CYP 450, siendo CYP2D6 y CYP2C19 las principales enzimas involucradas (Garcia y col., 2017).

El fármaco es administrado vía oral y se distribuye a través de todo el organismo. Es en el hígado donde la mayor parte es transformada en el metabolito O-desmetilvenlafaxina (Figura 3), el cual posee la misma actividad farmacológica de la venlafaxina; a la vez también por N-metilación se producen dos metabolitos en menor cantidad: N,O–didesmetilvenlafaxina y N-desmetilvenlafaxina. La formación de la O-desmetilvenlafaxina es mediada por la citocromo oxidasa P450 2D6 (CYP2D6), mientras que los productos de la N-metilación son formados mediante la acción de la citocromo oxidasa P450 3A4 (CYP3A4) (Ereshefsky y col., 2000).

Dos enzimas participantes en menor grado son CYP2C19 y CYP2D9, las cuales actúan en la conversión de venlafaxina a N-desmetilvenlafaxina y N,O-didesmetilvenlafaxina. La N,O-didesmetilvenlafaxina puede ser metabolizada posteriormente convirtiéndose en N,N,O-tridesmetil venlafaxina, o conjugándose en glucurónido de N,O-didesmetilvenlafaxina, desechados ambos por la vía renal (Howell y col., 1993; Sangkuhl y col., 2014).

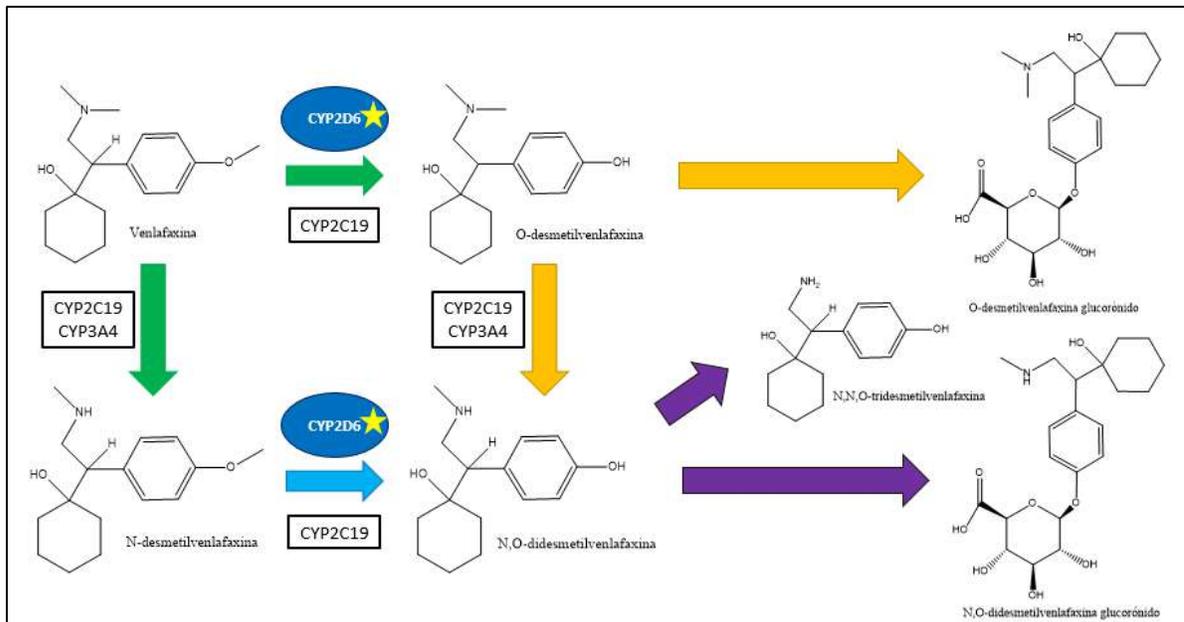


Figura 3. Metabolismo de venlafaxina.

I.6 El gen *CYP2D6*

El gen *CYP2D6*, ubicado en el cromosoma 22, cuenta con 4,139 pares de bases y codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan muchas reacciones involucradas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. La proteína *CYP2D6* se localiza en el retículo endoplásmico y metaboliza hasta 25% de los medicamentos comúnmente prescritos. Sus sustratos incluyen antidepresivos, antipsicóticos, analgésicos y antitusivos, bloqueadores β -adrenérgicos, antiarrítmicos y antieméticos (Otsuka, 1975).

I.7 Polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs por sus siglas en inglés) son cambios de un solo nucleótido en la secuencia de ADN, representan el 90% de los polimorfismos conocidos en la población. Para que una mutación de tipo SNPs sea considerada debe presentarse en al menos el 1% de la población.

Los SNPs son producidos cuando una base sustituye a otra, por ejemplo, una Adenina (A) que reemplaza a una de las otras bases nucleotídicas: Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G) presentes en la secuencia del ADN de un individuo. Estas variaciones son de gran importancia para la diversidad entre los individuos, y además pueden conducir a la presencia de fenotipos, rasgos específicos y enfermedades. Los SNPs pueden estar presentes en cualquier región del ADN, sea codificante o no codificante. En las regiones codificantes se ha observado que los SNPs pueden resultar en cambios en la secuencia de aminoácidos o generar un codón de paro, y esto por ende genera una proteína trunca o de función disminuida, lo que puede llevar a patologías asociadas con la proteína afectada. En el caso de las regiones no codificantes, estudios recientes sugieren que los SNPs regulan los niveles de transcripción génica en lugar de alterar la secuencia codificante de proteínas o la estructura de proteínas. Por lo tanto, los SNPs ubicados en regiones no codificantes involucradas en la regulación génica podrían estar estrechamente asociados con el desarrollo de enfermedades (Sun y col., 2014).

Identificar los SNPs es crucial, porque se asocian tanto a la susceptibilidad a diversas enfermedades como a la respuesta al tratamiento con medicamentos (Novelli, 2010). Identificarlos permite ahorro en los costos de tratamiento, además de medicina personalizada para el paciente; de igual manera son herramientas útiles para prevenir los efectos adversos que puede presentar el paciente.

I.8 Polimorfismos del gen *CYP2D6*

El gen *CYP2D6* es altamente polimórfico en la población humana. Las variantes del gen, originadas por mutaciones, son denominadas alelos y pueden afectar grandemente la actividad enzimática. Ciertos alelos dan como resultado un fenotipo metabolizador deficiente, caracterizado por disminución en la capacidad de metabolizar los sustratos de la enzima. Algunos individuos con fenotipo metabolizador deficiente no tienen proteínas funcionales cuando tienen los dos alelos

nulos, mientras que en otros individuos el gen está ausente debido a una deleción. El gen puede variar en número de copias y los individuos con el fenotipo metabolizador ultrarrápido pueden tener tres o más copias activas. Alternativamente, se han encontrado variantes de transcripción empalmadas que codifican diferentes isoformas del gen. Actualmente se conocen alrededor de 70 alelos diferentes de *CYP2D6* que son portados con distintas frecuencias en diferentes etnias (Shams y col., 2006).

Los alelos *CYP2D6**10, *17, *36 y *41 dan lugar a una actividad disminuida dependiente del sustrato. Los alelos nulos de *CYP2D6* no codifican una proteína funcional y no hay actividad enzimática residual detectable. Está claro que los alelos *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *19, *20, *21, *38, *40, *42, *44, *56 y *62 no tienen actividad enzimática. Son responsables del fenotipo deficiente cuando están presentes en constelaciones heterocigotas, homocigotas o compuestas. Estos alelos son de importancia clínica ya que a menudo causan alteración en el metabolismo y respuesta al fármaco. Entre las variantes más importantes están *CYP2D6**2, *3, *4, *5, *10, *17 y *41 (Zhou, 2009).

Se han realizado diversos estudios farmacogenéticos de diversos fármacos que son metabolizados por la enzima *CYP2D6* (Cuadro 1) en los cuales se ha encontrado que diferentes respuestas y efectos son producidos por los diversos alelos del gen (Zhou, 2009).

En pacientes con fenotipo *CYP2D6* deficiente se han observado cefaleas, mareos e incluso cardiopatías como reacciones adversas al tratamiento con venlafaxina (Wijnen y col., 2009).

Cuadro 1. Estudios farmacológicos reportados referentes a medicamentos metabolizados por CYP2D6.

Medicamento	Tipo	Respuesta / toxicidad
Atomoxetina	Déficit de atención e hiperactividad	Aumento en los efectos adversos en MD
Carvedilol	Beta-bloqueador	ND
Clorfenamina	Antihistamínico	ND
Clorpromazina	Antipsicótico	ND
Clomipramina	TCA	Escasa evidencia de alteración en su efecto.
Codeina	Opioide	Reducción de analgesia; menor dependencia opioide
Desipramina	TCA	ND
D	Opioide	Efecto analgésico similar en MD y ME.
Doxepina	TCA	Escasa evidencia de alteración en su efecto.
Flecainida	Antiarrítmico	Aumento en los efectos adversos en MD
Fluoxetina	SSRI	Escasa evidencia de aumento en efectos adversos
Imipramina	TCA	Poca evidencia de efecto alterado / aumento en la sedación o hipotensión postural
Maprotilina	TCA	Incremento en el efecto pulmonar.
Metropolol	Beta-bloqueador	Escasa evidencia de aumento en efectos adversos
Mexiletina	Antiarrítmico	El valor más alto de mexiletina / p-hydroxymexiletina en MD
Mianserina	Antidepresivo	Ligeramente mayor respuesta

Medicamento	Tipo	Respuesta / toxicidad
Nortriptilina	TCA	Es más probable que tenga reacciones adversas dependientes de la dosis.
Paroxetina	SSRI	Aumento en la disfunción sexual en ME.
Perexilina	Agente antianginal	Aumenta toxicidad para MD.
Perpenazina	Antipsicótico	Aumenta efectos adversos en MD.
Propafenona	Antiarrítmico	Aumenta efectos adversos en MD.
Risperidona	Antipsicótico	Más efectos adversos en el SNC, y mayor beta-bloqueo en MD.
Tamoxifen	Modulador selectivo de receptores de estrógeno	Más recurrencias de cáncer de mama y períodos más cortos sin recaída en MD.
Tioridacina	Antipsicótico	NE
Timolol	Beta-bloqueador	Incrementa el efecto.
Tolterodina	antagonista del receptor muscarínico	Efecto antimuscarínico sin cambios.
Tramadol	Opioide	Menor efecto analgésico en MD.
Tropisetron	Antiemético	Disminuye el efecto antiemético.
Zuclopentixol	Antipsicótico	ND
<p>ND= No determinado, NE= No evidenciado, MD= Metabolizador deficiente, ME= Metabolizador extenso, SNC= Sistema nervioso central, SSRI= Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, TCA= Antidepresivo tricíclico.</p>		

(Continuación cuadro 1)

I.9 Farmacogenética

La farmacogenética estudia las respuestas de los individuos a los fármacos, tanto en términos de efectos terapéuticos como adversos, basadas en la variación de genes individuales (Luzzatto y col., 2014). De forma más amplia, la farmacogenómica abarca la asociación de variaciones en los diversos genes involucrados en el metabolismo de los fármacos. Para identificar los genes asociados a enfermedades particulares o la respuesta a fármacos se buscan marcadores en el genoma de personas afectadas y se comparan con los de personas no afectadas (Wang y col., 2015; Zhan y col., 2016).

Para lograr que el tratamiento individualizado con fármacos tenga resultados predecibles deben hacerse estudios farmacogenéticos y farmacogenómicos en poblaciones geográfica y étnicamente distintas (Vogenberg y col., 2010). El diseño y validación de un método para identificar los polimorfismos clínicamente relevantes del gen *CYP2D6* podría servir para ajustar la dosis de venlafaxina e incluso justificar el tratamiento con otro medicamento.

II. HIPÓTESIS

El diseño y validación de un método para identificar los polimorfismos clínicamente relevantes del gen *CYP2D6* permitiría ajustar la dosis de venlafaxina para el tratamiento del trastorno depresivo mayor.

III. OBJETIVOS

III.1 General

Desarrollar y validar un método para identificar los polimorfismos del gen *CYP2D6* a partir de DNA genómico extraído de sangre periférica.

III.2 Específicos

- Elaborar y estandarizar un protocolo para amplificar mediante PCR la región del gen *CYP2D6* que contenga los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) clínicamente relevantes.
- Secuenciar los productos de PCR e identificar los SNPs relevantes.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Materiales

Los materiales, equipos y reactivos que fueron utilizados para realizar este trabajo de tesis se enlistan a continuación:

IV.1.1 Aparatos/instrumentos

- Micropipetas 1000, 200, 100 y 10 μ L (Eppendorf, Smart, Rainin, Gilson)
- Balanza analítica (Citizen Mod. CY510)
- Vortex (Fisher vortex genie 2 Mod-G-560)
- Microcentrífuga (Gm Lab Gilson Mod. Capsulefuge PMC-880)
- Termociclador Touchgene gradient, Techne (Applied Biosystems 2720)
- Cámara de electroforesis Subcell GT (Bio-Rad Mod. 96)
- Fuente de poder (Bio-Rad, Power Pac 300, 2.5A Type T)
- Fotodocumentador GEL DOC XR+ (Bio-Rad)
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Nivel de burbuja
- Termociclador, 2720 Thermo Cycler (Applied Biosystems, EU).
- Horno de microondas, Carousel (SHARP, Japón).
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek[®], EU).

IV.1.2 Materiales

- Guantes.
- Puntas 100, 250 y 10 μ L nuevas y estériles.
- Masking tape.
- Marcador indeleble.
- Recipientes plástico p/desechos.
- Portagel 25x10x0.7 cm
- Peine 50 dientes.

- Peine 20 dientes.
- Gradillas.
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Tubos eppendorf 200 μ L
- Hielera.
- Gradilla enfriadora para tubos de PCR.
- Frasco de vidrio de 500 mL.
- Recipiente de plástico para tinción con EtBr.
- Parafilm.

IV.1.3 Reactivos

- Agua MilliQ (estéril).
- SB 1x (Borato de sodio).
- Agarosa (Invitrogen UltraPure).
- Hielo picado.
- EtBr 1 μ g/mL.
- Cloralex 1%.
- Etanol 70% (grado técnico).
- Buffer de carga Orange G 6x (glicerol; xilencianol y azul de bromofenol).
- Buffer PCR 10x (Invitrogen, Brasil).
- $MgCl_2$ 50 mM (Invitrogen, Brasil).
- dNTPs (10mM).
- Oligos CYP2D6-AlfaF y CYP2D6-AlfaR.
- Oligos CYP2D6-BetaF y CYP2D6-BetaR.
- Oligos CYP2D6-GammaF y CYP2D6-GammaR.
- Taq polimerasa ACTaq Blue 1U/ μ L (ACTGene, EU).
- DreamTaqTM polimerasa 5U/ μ L (Fermentas, EU).
- Cloroformo.
- Etanol para biología molecular.
- Isopropanol para biología molecular.

- Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
- Solución de NaCl 5 M.
- Proteinasa K 20 mg/mL libre de nucleasas.
- Buffer TAE 1x.
- Buffer TES 1x.
- Buffer TE 1x.

IV.2 Métodos

IV.2.1 Toma de muestra y almacenamiento

Para este proceso se trabajó con muestras sanguíneas obtenidas de 20 donadores voluntarios del Hospital General del ISSSTE en San Luis Potosí, tomadas por punción venosa en tubos con EDTA como anticoagulante que fueron almacenadas en un refrigerador a 4°C para usos posteriores.

IV.2.2 Extracción y purificación de DNA

Se trabajó en una zona higienizada con etanol al 70% limpiando la superficie y las micropipetas con un paño humedecido con etanol. Se colocaron 200 μ L de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le añadió 500 μ L de buffer TES, 50 μ L de SDS al 10% y 10 μ L de proteinasa K (20 mg/ μ L). Se agitó el tubo en vórtex a velocidad media durante 1 minuto para cerciorar que se mezcle cada componente; una vez homogenizada la mezcla se incubó en un termoblock a 55 °C por 3 h dándole agitación con el vórtex cada 10 min.

Al término de la incubación se añadieron 500 μ L de cloroformo, se mezcló bien la muestra y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y rotulado, cuidando de no acarrear residuos de la interfase. El tubo con cloroformo fue desechado en el contenedor de residuos orgánicos.

A la fase acuosa se le añadieron 150 μ L de NaCl 5 M y se agitó vigorosamente de forma manual hasta observar formación de espuma. Luego se centrifugó a 13,000

rpm por 15 min, se aspiró el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL. Para precipitar el ADN se añadieron 500 μ L de isopropanol a -20 °C, se agitó suavemente por inversión e incubó a -20 °C por 3 h.

Al término de la incubación se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm por 15 min y se descartó cuidadosamente el sobrenadante para no perder la pastilla de ADN. Se añadieron 700 μ L de etanol al 70%, se dio un ligero pulso en el vórtex a baja velocidad, se centrifugó a 13,000 rpm y se decantó el etanol cuidadosamente para no perder la pastilla. El proceso de lavado por centrifugación con etanol se repitió dos veces más para limpiar el ADN. Para evaporar los residuos de etanol, se colocó el tubo con la pastilla de ADN en un termoblock a 55 °C durante unos min; una vez seco se añadieron 50 μ L de buffer TE y se dejó reposar la muestra 30 min a temperatura ambiente.

IV.2.3 Determinación de la concentración de ADN y Pureza.

Para determinar la concentración de ADN (ng/ μ L) y la pureza (relación de absorbancia a 260nm/280nm) se utilizó el espectrofotómetro Epoch (Biotek®, EU).

Una vez que se determinó el contenido de ADN, se realizó el cálculo del volumen de buffer TE 1X necesario para ajustar la concentración a 20 ng/ μ L en cada muestra y se prepararon alícuotas de 50 μ L para almacenarlas de la siguiente manera:

- Se almacenaron a 4°C los tubos requeridos para la PCR.
- Se almacenaron a -20°C los tubos restantes para usos futuros.

IV.2.4 Diseño de oligonucleótidos iniciadores

Para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores se utilizó la herramienta informática PrimerBlast del National Center for Biotechnology information (NCBI) para obtener las secuencias forward y reverse. La secuencia que se utilizó como referencia es AY545216.1 del GeneBank correspondiente al alelo *CYP2D6*1* reconocido como el

tipo silvestre (wild type). Dada la longitud del gen se propuso la amplificación de tres regiones denominadas: Alfa, Beta y Gamma.

Esta propuesta fue con la finalidad de que se pueda amplificar las regiones donde se encuentran los SNPs de interés que se pretende detectar mediante el método propuesto (Cuadro 2). Una vez determinadas las secuencias de los iniciadores, estas fueron analizadas con la aplicación OligoAnalyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies (IDT®, EU) de las cuales se seleccionaron aquellos en los que se observó que no forman estructuras secundarias que pudieran afectar negativamente la PCR (Cuadro 3).

Cuadro 2. Alelos que se propone detectar con el método y SNPs que los integran.

Alelo	SNP	Tipo de cambio	Región
2	rs1058164	C por G	Beta
	rs16947	G por A	Gamma
3	rs35742686	Delección de T	Gamma
3B	rs1135824	T por C	Beta
	rs35742686	delección de T	Gamma
4	rs1058164	C por G	Beta
	rs1065852	G por A	Alfa
	rs28371703	G por T	Beta
	rs28371704	T por C	Beta
	rs28371705	G por C	Beta
	rs3892097	C por T	Beta
5	Delección completa del gen		
6	rs5030655	DEL A	Beta
7	rs5030867	T por G	Gamma
8	rs1058164	C por G	Beta
	rs16947	G por A	Gamma

Alelo	SNP	Tipo de cambio	Región
	rs5030865	C por A	Beta
9	rs5030656	DEL CTT	Gamma
10	rs1058164	C por G	Beta
	rs1065852	G por A	Alfa
17	rs1058164	C por G	Beta
	rs16947	G por A	Gamma
	rs28371706	G por A	Beta
33	rs28371717	C por A	Gamma
34	rs16947	G por A	Gamma
39	rs1058164	C por G	Beta
41	rs1058164	C por G	Beta
	rs1080995	C por G	Alfa
	rs1080996	G por T	Al fa
	rs1080997	G por C	Alfa
	rs1080998	A por G	Alfa
	rs1081000	T por C	Alfa
	rs16947	G por A	Gamma
	rs28371725	C por T	Gamma
	rs28695233	T por G	Alfa
	rs29001518	C por G	Alfa

(Continuación Cuadro 2)

Cuadro 3. Oligonucleótidos (primers) propuestos en este trabajo de tesis

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Tm (°C)	%GC	Tamaño esperado
Alfa-F	TGTGTCCAGAGGAGCCCATT	60.84	55	339 pb
Alfa-R	CCAAACCTGCTTCCCCTTCTC	60.89	57.14	
Beta-F	CTGGGGTGATCCTGGCTTGA	61.57	60	1039 pb
Beta-R	AAGAGACCGTTGGGGCGAAA	62.05	55	
Gamma-F	AGAGCACAGGAGGGATTGAG	60.13	57.14	686 pb
Gamma-R	TATGTTGGAGGAGGTCAGGCT	60.27	52.38	

Se solicitó la síntesis de los iniciadores a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT®, EU). Una vez que llegaron se procedió a preparar soluciones madre (100 µM) por disolución en buffer TE 1x, como se enlista en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Preparación de las soluciones madre de oligonucleótidos (100 µM)

Oligonucleótido	Secuencia	Bases	TE 1x (µL)
CYP2D6 Alfa-F	TGTGTCCAGAGGAGCCCATT	20	734
CYP2D6 Alfa-R	CCAAACCTGCTTCCCCTTCTC	21	1089
CYP2D6 Beta-F	CTGGGGTGATCCTGGCTTGA	20	1157
CYP2D6 Beta-R	AAGAGACCGTTGGGGCGAAA	20	878
CYP2D6 Gamma-F	AGAGCACAGGAGGGATTGAG	21	560
CYP2D6 Gamma-R	TATGTTGGAGGAGGTCAGGCT	21	684

Posteriormente se prepararon alícuotas de 300 µL de soluciones de trabajo de cada oligonucleótido (10 µM), mezclando 30 µL de solución madre con 270 µL de agua MilliQ y fueron almacenadas a -20°C.

IV.2.5 Amplificación del gen *CYP2D6*

Para la amplificación de las regiones del gen *CYP2D6* se determinaron las mejores condiciones de la PCR empleando un termociclador Touchgene gradient, Techne (Applied Biosystems 2720). Se probaron seis diferentes temperaturas de alineamiento (T_a) y un gradiente de concentración de $MgCl_2$ en el rango de 1.5 – 3 mM (Cuadro 5).

Cuadro 5. Gradiente de temperatura y concentración de $MgCl_2$ que se probó para la amplificación de segmentos *CYP2D6*- α y - γ .

T_a (°C)	$MgCl_2$			
	1.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	3.0 mM
58.5	1	1	1	1
59.6	1	1	1	1
61.0	1	1	1	1
62.2	1	1	1	1
63.7	1	1	1	1
65.0	1	1	1	1
N	6	6	6	6

En el caso de la región β se utilizó la enzima DreamTaq™ polimerasa 5U/ μ L (Fermentas, EU) y su respectivo buffer, que contiene $MgCl_2$ 2 mM. Debido a que se observó la presencia de productos inespecíficos, se decidió probar temperaturas de alineamiento mayores (Cuadro 6).

Cuadro 6. Gradiente de temperatura probado para la amplificación del segmento β a una concentración de $MgCl_2$ 2 mM.

Ta (°C)	MgCl ₂
	2.0 mM
60.5	1
61.6	1
63.0	1
64.0	1
65.7	1
67.0	1
N	6

Para evaluar la eficiencia de la amplificación se sometieron los productos de PCR a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se aplicaron muestras de 6 μ L de la mezcla de PCR con 2 μ L de buffer de carga. Se corrió la electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer de borato de sodio (SB) para el caso de los segmentos CYP2D6- α y γ y en el caso del segmento β se utilizó geles de agarosa al 1.2% preparados con buffer Tris- acetato EDTA (TAE). Al finalizar la corrida electroforética se realizó una tinción del gel con bromuro de etidio y se registró la imagen del gel por transiluminación con luz ultravioleta en un fotodocumentador GEL DOC XR+ (Bio-Rad®).

IV.2.6 Secuenciación

Una vez que se confirmó la presencia de las bandas con los productos de PCR en el gel, se purificaron a partir de las mezclas de reacción. A 19 μ L de cada mezcla de PCR se le añadió 1.9 μ L de acetato de sodio 3 M y 57 μ L de etanol grado biología molecular a -20 °C. se incubaron las mezclas por 3 h, se centrifugaron durante 15 min a 13,000 rpm, se decantaron cuidadosamente y se agregaron 700 μ L de etanol al 70% a la pastilla, se les dio un ligero pulso en vórtex a velocidad baja y nuevamente se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min. Para evaporar el etanol residual se

colocaron los tubos en un termoblock a 55 °C durante unos min, se re disolvió la pastilla en 50 µL de agua MilliQ estéril y se dejó reposar la solución por 30 min a temperatura ambiente.

Una vez disuelto el ADN, se determinó la relación A_{260}/A_{280} y su concentración en el espectrofotómetro Epoch (Biotek®, EU) directamente. Para la secuenciación se prepararon muestras de cada producto de PCR a 15 ng/µL y 5 µL de oligos 5 µM por cada reacción. Las muestras fueron secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) con el método de Sanger.

IV.2.7 Análisis de las secuencias

Para verificar la identidad de los productos de PCR se analizó la secuencia de cada uno por alineamiento con la secuencia de referencia empleando el programa MultiAlin (Corpet, 1988). Una vez confirmada la identidad se analizó el perfil cromatográfico con el programa FinchTV[®] versión 1.5.0 (Geospiza inc.) para determinar si la secuencia era silvestre o polimórfica y en este caso si el alelo es homocigoto o heterocigoto (Figura 4). Para registrar, ordenar e interpretar los resultados de la secuenciación se utilizó el procesador Microsoft Word y la hoja de cálculo Excel.

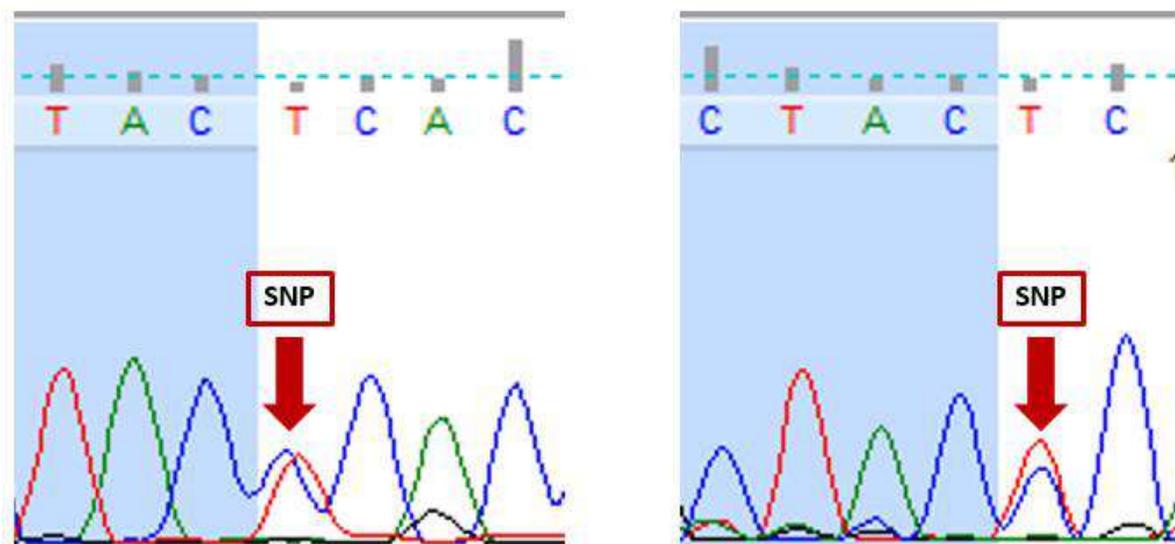


Figura 4. Ejemplo de un cromatograma en el que se identifica un SNP heterocigoto con dos picos de color rojo y azul en la secuencia forward (T/A) en la imagen de la izquierda y reverse (T/A) en la imagen de la derecha.

IV.2.8 Diseño experimental

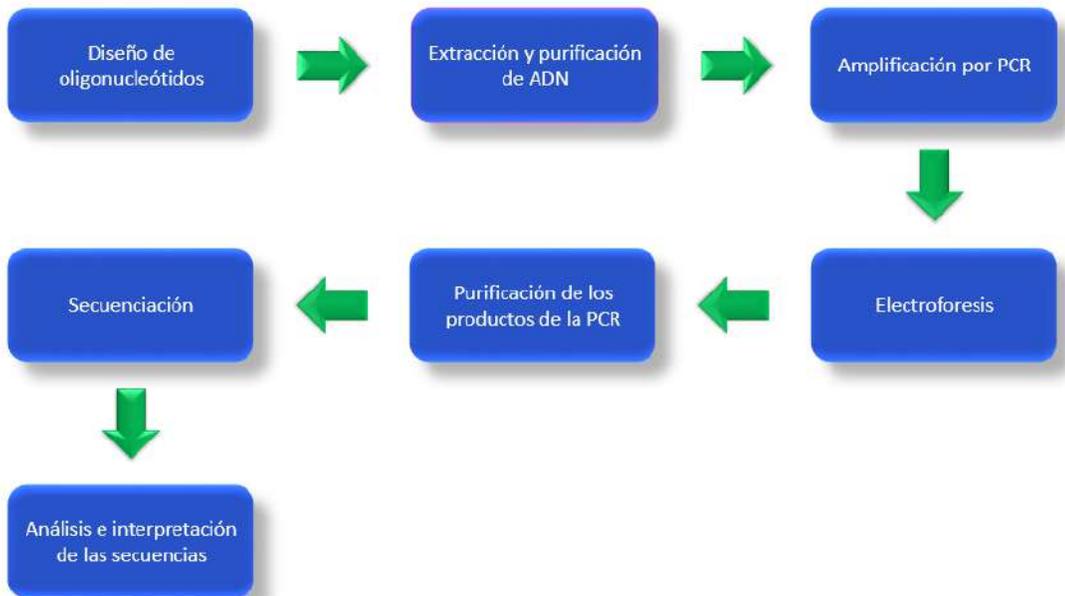


Figura 5. Secuencia del trabajo experimental que se realizó.

V. RESULTADOS

V.1 Extracción y purificación del ADN

Las lecturas obtenidas del espectrofotómetro Epoch (Biotek®, EU) se enlistan en el Cuadro 7 y la preparación de las muestras en el Cuadro 8.

Cuadro 7. Concentración y pureza del ADN

Muestra	ng/ μ L	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	118.7	1.7
2	77.0	1.9
3	165.7	1.9
4	78.0	1.9
5	137.5	1.8
6	103.1	1.8
7	18.2	1.6
8	86.8	1.8
9	28.7	1.8
10	59.0	1.8
11	56.0	1.9
12	50.3	1.8

Cuadro 8. Volúmenes de TE 1X añadidos a las muestras de ADN para ajustar la concentración a 20 ng/ μ L

Muestra	ADN inicial (ng/ μ L)	TE 1X (μ L)	ADN final (ng/ μ L)
1	118.8	128.3	20
2	77.0	74.1	20
3	165.7	189.4	20
4	78.0	75.4	20
5	137.5	152.8	20
6	103.1	108.0	20
7	18.2	0.0	18.2
8	86.8	86.8	20
9	28.7	11.3	20
10	59.0	50.7	20
11	56.0	46.8	20
12	50.3	39.4	20

V.2 Amplificación del segmento CYP2D6- α

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la amplificación del segmento CYP2D6- α (Figura 6) en donde podemos observar un patrón de bandeo correspondiente a un tamaño aproximado de 300pb en la mayoría de las mezclas de PCR, lo cual indica que en esas condiciones se logró amplificar un fragmento de tamaño aproximado al que se esperaba amplificar de 339pb (Cuadro 9) , algunas bandas presentan mayor intensidad que otras, lo cual indica que las más intensas cuentan con una mayor concentración de producto amplificado y las condiciones son más óptimas para la amplificación (Cuadro 10).

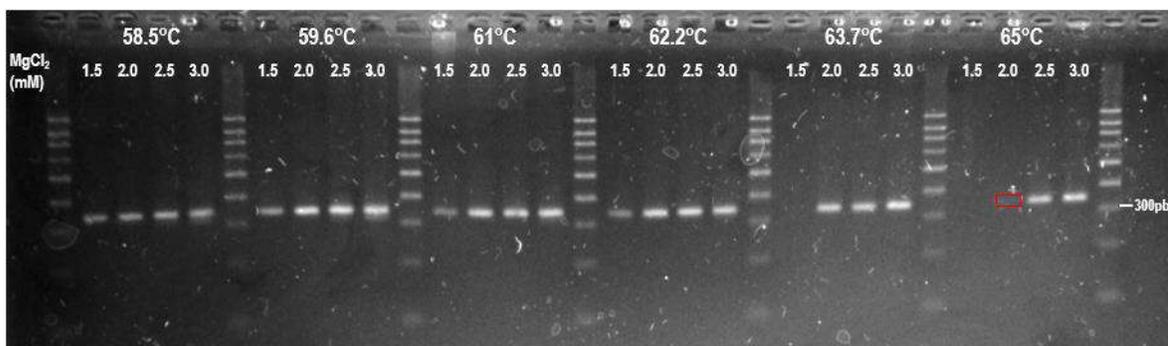


Figura 6. Gel de electroforesis correspondiente a las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6- α (25 μ L, 30 ciclos). El cuadro rojo señala la presencia de una banda de baja intensidad.

Cuadro 9. Presencia de la banda CYP2D6- α (339 pb) en mezclas de PCR con MgCl₂ 1.5-3 mM amplificadas por 30 ciclos con temperaturas de annealing de 58.5 a 65.0 °C

°C	MgCl ₂ (mM)			
	1.5	2.0	2.5	3.0
58.5	Sí	Sí	Sí	Sí
59.6	Sí	Sí	Sí	Sí
61.0	Sí	Sí	Sí	Sí
62.2	Sí	Sí	Sí	Sí
63.7	NO	Sí	Sí	Sí
65.0	NO	Sí	Sí	Sí

Cuadro 10. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- α (339 pb) con MgCl₂ 1.5-3 mM y temperaturas de annealing de 58.5 a 65°C.

°C	MgCl ₂ 1.5 mM		MgCl ₂ 2 mM		MgCl ₂ 2.5 mM		MgCl ₂ 3 mM	
58.5	108567	0.395	133569	0.486	159327	0.580	189675	0.691
59.6	127143	0.463	218241	0.795	256473	0.934	274671	1.000
61.0	78111	0.284	186705	0.680	188649	0.687	225450	0.821
62.2	86238	0.314	189810	0.691	188919	0.688	177687	0.647
63.7	0	0.000	157383	0.573	152334	0.555	217377	0.791
65.0	0	0.000	21438	0.078	138348	0.504	174312	0.635

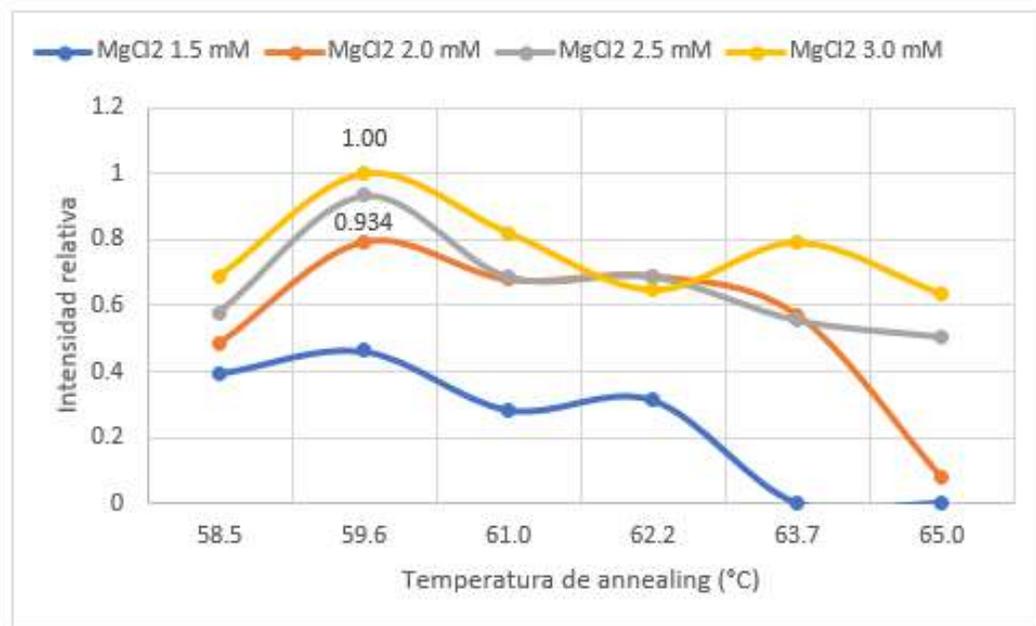


Figura 7. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- α (339 pb) en función de la concentración de MgCl₂ y la temperatura de annealing.

V.3 Amplificación del segmento CYP2D6-β

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la amplificación del segmento CYP2D6-β (Figura 8) en donde se observó al revelar el gel de electroforesis un patrón de bandeo en todas las mezclas de PCR sometidas a diferentes temperaturas (Cuadro 11), en este caso se observó que en cada mezcla de PCR se amplificó un producto un tamaño mayor a 900 pb de gran intensidad (Cuadro12), lo cual indica que se logró la amplificación de un fragmento de un tamaño similar al que se esperaba de 1039 pb

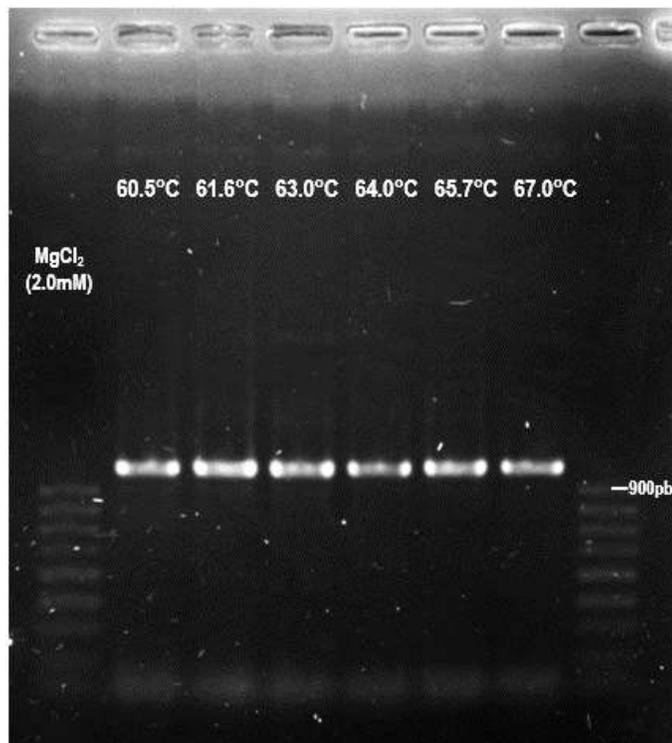


Figura 8. Gel de electroforesis las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6-β (25 μL, 30 ciclos)

Cuadro 11. Presencia de la banda CYP2D6- β (1039 pb) en mezclas de PCR con $MgCl_2$ 2 mM amplificadas 30 ciclos con temperaturas de annealing de 60.5 a 67.0°C.

°C	Banda
60.5	Sí
61.6	Sí
63.0	Sí
64.0	Sí
65.7	Sí
67.0	Sí

Cuadro 12. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- γ (1039 pb) en mezclas de PCR con $MgCl_2$ 2 mM y temperaturas de annealing de 60.5 a 67.0 °C.

°C	Intensidad (píxeles)	
	Absoluta	Relativa
60.5	419934	0.46
61.6	664122	0.73
63.0	861441	0.95
64.0	683553	0.75
65.7	911574	1.00
67.0	653922	0.72

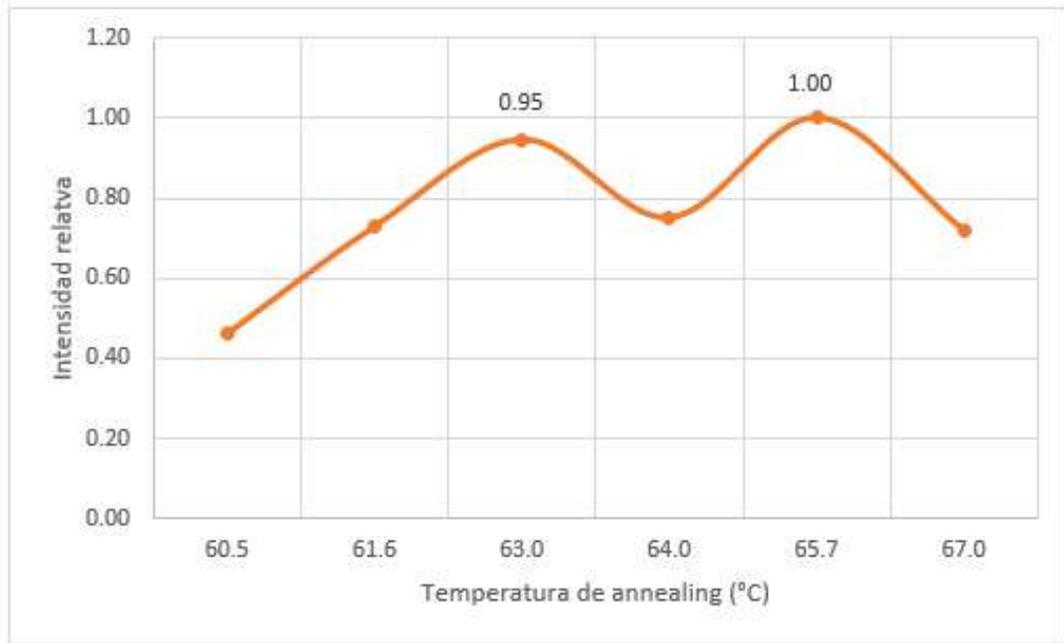


Figura 9. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- β (1039 pb) en función de la temperatura de annealing.

V.4 Amplificación del segmento CYP2D6-γ

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la amplificación del segmento CYP2D6-γ (Figura 10) en donde podemos observar un patrón de bandeo correspondiente a un tamaño aproximado de 700pb en la mayoría de las mezclas de PCR, lo cual indica que en esas condiciones se logró amplificar un fragmento de tamaño aproximado al que se esperaba amplificar de 689pb (Cuadro 13) , algunas bandas presentan mayor intensidad que otras, lo cual indica que las más intensas cuentan con una mayor concentración de producto amplificado y las condiciones son más óptimas para la amplificación (Cuadro 14).

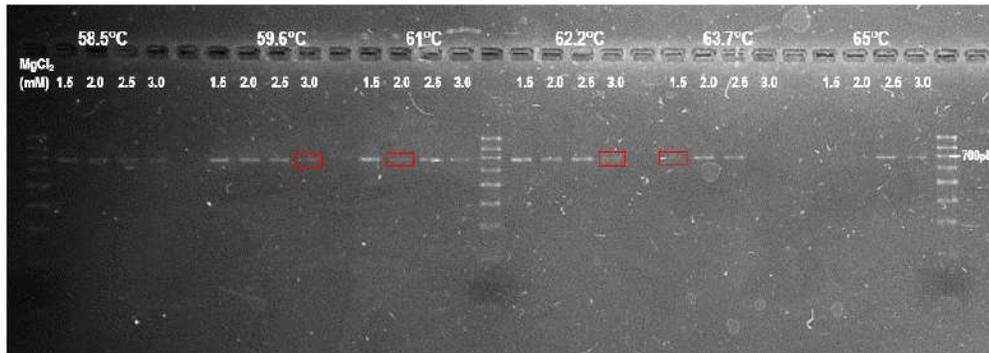


Figura 10. Electroferograma de las mezclas de PCR para el segmento CYP2D6-γ (25 μL, 30 ciclos). Los cuadros rojos señalan bandas de baja intensidad.

Cuadro 13. Presencia de la banda CYP2D6-γ (680 pb) en mezclas de PCR con MgCl₂ 1.5-3 mM amplificadas 30 ciclos con temperaturas de annealing de 58.5 a 65.0 °C.

°C	MgCl ₂ (mM)			
	1.5	2.0	2.5	3.0
58.5	Sí	Sí	Sí	Sí
59.6	Sí	Sí	Sí	Sí
61.0	Sí	Sí	Sí	Sí
62.2	Sí	Sí	Sí	Sí
63.7	Sí	Sí	Sí	NO
65.0	NO	NO	Sí	Sí

Cuadro 14. Intensidad absoluta (píxeles) y normalizada (máxima = 1.00) de la banda CYP2D6- γ (680 pb) con MgCl₂ 1.5-3 mM y temperaturas de annealing de 58.5 a 65°C.

°C	MgCl ₂ 1.5 mM		MgCl ₂ 2 mM		MgCl ₂ 2.5 mM		MgCl ₂ 3 mM	
58.5	20088	0.48	18312	0.44	27216	0.65	18264	0.44
59.6	39696	0.95	36024	0.86	26280	0.63	22056	0.53
61.0	41712	1.00	12528	0.30	35256	0.85	15624	0.37
62.2	30024	0.72	19536	0.47	28944	0.69	13752	0.33
63.7	12360	0.30	22560	0.54	18624	0.45	0	0
65.0	0	0	0	0	23568	0.57	27552	0.66

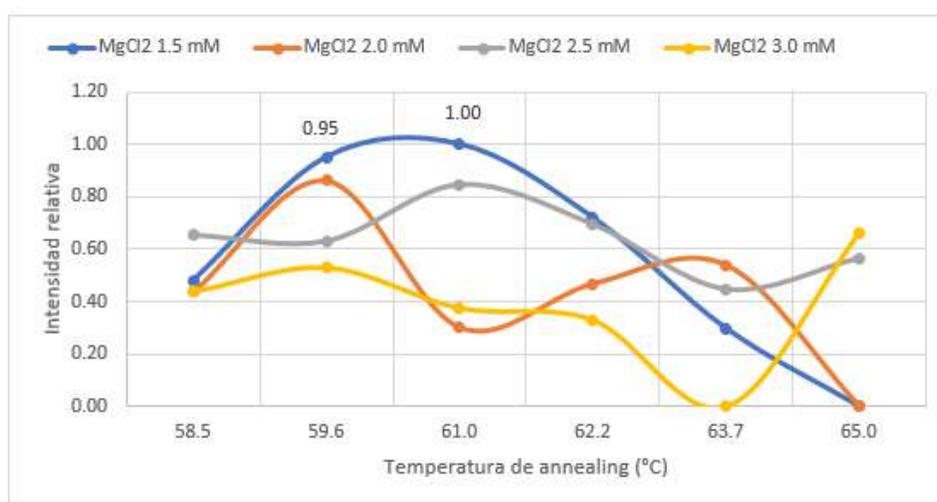


Figura 11. Intensidad relativa de la banda CYP2D6- γ (680 pb) en función de la concentración de MgCl₂ y la temperatura de annealing.

V.5 Amplificación de los tres segmentos con ADN

Las condiciones que se seleccionaron para la amplificación de los tres segmentos son las siguientes:

Cuadro 15. Temperaturas de annealing y concentraciones de MgCl₂ elegidas para amplificar los segmentos CYP2D6- α , - β y - γ por 30 ciclos.

Fragmento	°C	MgCl ₂ (mM)
CYP2D6- α	61	2.5
CYP2D6- β	66	2
CYP2D6- γ	61	1.5

A continuación se presenta un ejemplo de la amplificación de las tres regiones en dos pacientes diferentes en donde se puede observar en el gel la presencia de tres bandas similares a los tamaños esperados en cada uno (Figura 12).

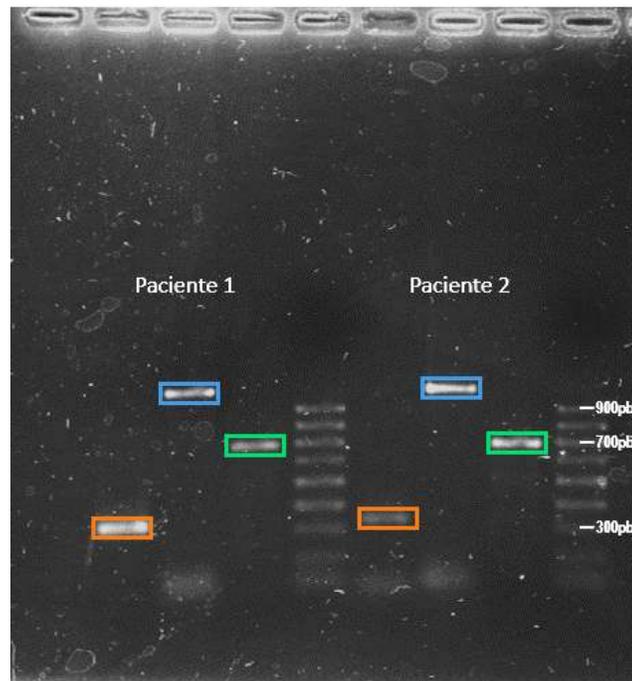


Figura 12. Patrón de bandeo de los segmentos CYP2D6- α (naranja), CYP2D6- β (azul) y CYP2D6- γ (verde) amplificados a partir del ADN de dos pacientes en las condiciones descritas en el cuadro 15.

V.6 Secuenciación

Una vez purificados, los productos de PCR se analizaron para obtener las secuencias de los segmentos CYP2D6- α , - β y - γ de cada muestra.

V.7 Alineamientos

Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas por los primers forward y reverse de las muestras de cada segmento CYP2D6- α , - β y - γ por comparación con la secuencia de referencia del gen silvestre. A continuación, se muestran ejemplos de los alineamientos obtenidos de cada región (Figuras 13,14 y 15).



Figura 13. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6- α .

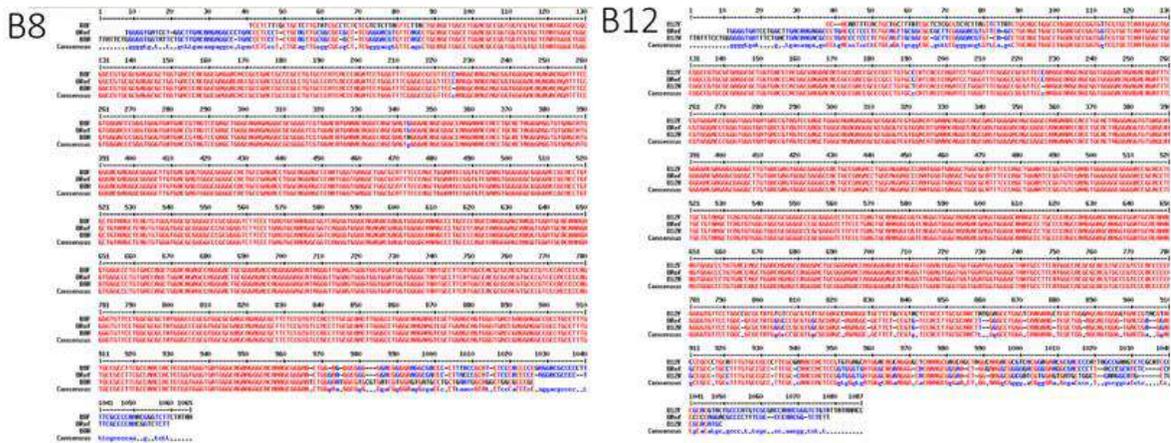


Figura 14. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6-β.

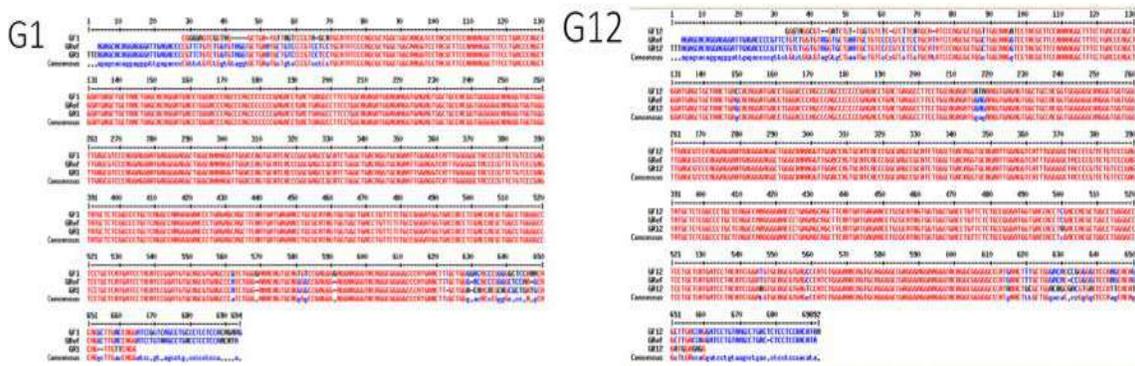


Figura 15. Ejemplo de alineamientos de las secuencias obtenidas del segmento CYP2D6-γ.

A través de los alineamientos se observó que las secuencias obtenidas efectivamente corresponden a las regiones que se esperaba amplificar con los oligos diseñados.

V.8 Análisis de las secuencias y determinación del genotipo

Del análisis de las secuencias se obtuvo la frecuencia de los SNPs clínicamente relevantes (Cuadro 16).

Cuadro 16. Frecuencia de SNPs clínicamente relevantes.

Identificador SNP	WT (silvestre)	Heterocigoto	Homocigoto mutante
rs1065852	16 (80 %)	3 (15 %)	1 (5 %)
rs1080995	12 (60 %)	8 (40 %)	0 (0 %)
rs1080996	12 (60 %)	6 (30 %)	2 (10 %)
rs1080997	12 (63.2 %)	7 (36.8 %)	0 (0 %)
rs1080998	11 (57.9 %)	8 (42.1 %)	0 (0 %)
rs1081000	10 (50 %)	8 (40 %)	2 (10 %)
rs29001518	20 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs1058164	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs1135824	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371703	11 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371704	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371705	11 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs3892097	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs5030655	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371706	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs35742686	20 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs5030867	12 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs5030656	20 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371717	19 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
rs28371725	19 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

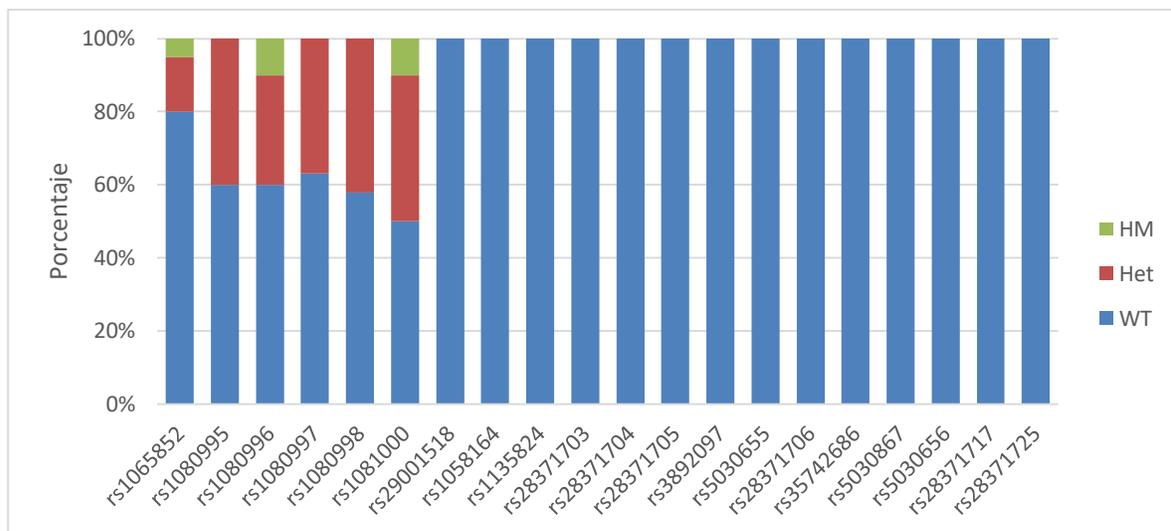


Figura 16. Gráfica de la frecuencia de SNPs clínicamente relevantes (**WT**= Tipo silvestre, **Het**= Heterocigoto, **HM**= Homocigoto).

Los SNPs seleccionados corresponden a los alelos más comúnmente asociados con fallas terapéuticas en el uso de venlafaxina (Cuadro 17) y las permutaciones de estos alelos permiten predecir el fenotipo metabolizador (Cuadro 18).

Cuadro 17. Perfil de SNPs de los alelos asociados a venlafaxina.

Alelo	Variante	Actividad
*1	-	Normal
*3	rs35742686	Inactivo
*4	rs1065852, rs28371703, rs28371704, rs28371705, rs1058164, rs3892097	Inactivo
*5	del gen	Inactivo
*6	rs5030655	Inactivo
*10	rs1065852, rs1058164	Disminuida
*41	rs1080995, rs1080996, rs1080997, rs1080998, rs29001518, rs28695233, rs1081000, rs1058164, rs16947, rs28371725	Disminuida

Cuadro 18. Fenotipos metabolizadores predichos por el genotipo *CYP2D6*.

Fenotipo	Características
Normal	Dos alelos con actividad normal (*1)
Intermedio	Dos alelos con actividad disminuida (*10 o *41) Un alelo activo (*1) y un alelo inactivo (*3, *4, *5, *6) Un alelo con actividad disminuida (*10 o *41) y un alelo inactivo (*3, *4, *5, *6).
Pobre	Dos alelos inactivos (*3, *4, *5, *6)
Ultrarrápido	Duplicación de un alelo activo (*1) en ausencia de alelos inactivos o de actividad disminuida

En las muestras analizadas encontramos los genotipos y fenotipos descritos en el Cuadro 19 y la frecuencia en la que se presentaron. De este análisis se observó que la predominancia en el grupo analizado fue de fenotipo intermedio (Figura 17 y 18).

Cuadro 19. Genotipos de *CYP2D6* encontrados y fenotipos metabolizadores predichos.

Genotipo	Fenotipo	Frecuencia
*1/*1	Normal	4 (30.8 %)
*1/*10	Intermedio	2 (15.4 %)
*1/*41	Intermedio	6 (46.2%)
*10/*10	Intermedio	1 (7.7 %)

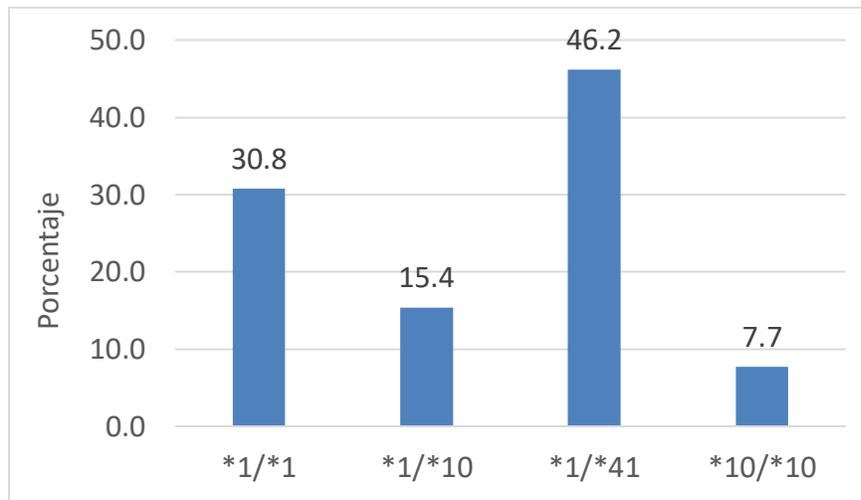


Figura 17. Gráfica de la frecuencia (porcentaje) de genotipos de CYP2D6 encontrados.

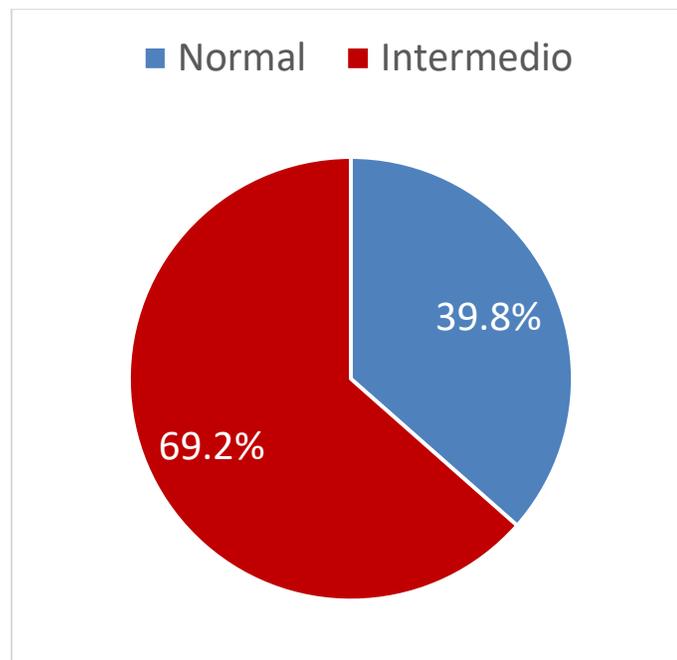


Figura 18. Fenotipos de CYP2D6 (porcentaje).

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Extracción y purificación de ADN

En este proceso observamos que la concentración más alta obtenida fue de 165.7 ng/ μ L lo cual representó una cantidad más que suficiente para realizar los experimentos siguientes e indica que el protocolo seguido para la extracción y purificación de ADN genómico fue adecuado para el propósito de este trabajo. Por otro lado, la mínima concentración de ADN obtenida fue de 18.2 ng/ μ L en una sola muestra, que también fue suficiente para la amplificación y secuenciación. El bajo rendimiento puede deberse a diversos factores, que van desde el estado en el que se encuentra la muestra, hasta un error técnico en la manipulación.

El rango de la relación A_{260}/A_{280} del ADN que es un indicador de la pureza (máximo esperado: 2.0) fue de 1.6-1.9, e indicó que las muestras eran aptas para la amplificación por PCR. La muestra con la pureza más baja también tuvo la concentración más baja, lo cual sugiere que este resultado puede deberse al mal estado o manipulación inadecuada de la muestra.

VI.2 Amplificación de los segmentos CYP2D6- α , - β y - γ .

La amplificación de los tres segmentos fue exitosa. En el caso del segmento CYP2D6- α (Figura 6) se obtuvo una banda única de 339 pb con intensidad máxima en las mezclas de PCR con annealing a 59.6 °C y concentración de $MgCl_2$ 2.5mM (0.93) o 3.0 mM (1.00), por lo que ambas condiciones se consideraron óptimas. Por otro lado, la ausencia de bandas con $MgCl_2$ 1.5 mM y annealing entre 63.7 °C y 75.0 °C indica que la menor concentración de $MgCl_2$ y las temperaturas más altas no permiten la amplificación del segmento, esto puede generarse debido a que la concentración del ion Mg^{++} funge como un elemento importante ya que es determinante en la eficiencia y especificidad de la reacción por lo que a una concentración baja de la fuente del ion propicia a que sea más bajo el rendimiento

de la reacción y podemos observarlo en las demás mezclas con la concentración de 1.5 mM se puede observar una banda menos intensa, la razón de que desaparezca a altas temperaturas puede deberse a que altas temperaturas favorecen que los oligos se separen de las cadenas moldes de ADN por lo que no se generan suficientes copias para verse en él o no hay amplificación (Arredondo, 1993). En las mezclas con las concentraciones de $MgCl_2$ y temperaturas de annealing restantes hubo menor amplificación de una banda única (0.28-0.83).

En el caso del segmento CYP2D6- β se amplificaron bandas de un tamaño superior a 900pb (Figura 8) con temperaturas de annealing en el rango de 60.5-67.0 °C probado y las de máxima intensidad fueron las de annealing a 63.0 °C (95%) y 65.7 °C (100%) con $MgCl_2$ 2 mM. El aumento de las temperaturas de annealing resultó efectivo para prevenir la amplificación de productos inespecíficos que estuvieron ausentes en este experimento dado que el incremento de la temperatura apoya la especificidad de los oligos permitiendo que hibriden con la región para la cual fueron diseñados.

Para la amplificación del segmento CYP2D6- γ (Figura 10), las condiciones óptimas correspondieron a mezclas con temperatura de annealing a 59.6 °C (95%) y 61 °C (100%) y $MgCl_2$ 1.5 mM con una banda única de 689 pb. Por otro lado, se observó ausencia de bandas tanto en mezclas con $MgCl_2$ 1.5 mM y 2 mM y annealing a 65.7 °C y con $MgCl_2$ 3 mM y annealing a 63.7 °C. Se generó una banda única menos intensa (30%-85%) con las concentraciones de $MgCl_2$ y temperaturas de annealing restantes.

Dado que las temperaturas de annealing óptimas para amplificar los segmentos CYP2D6- α y CYP2D6- γ son cercanas, con annealing 61 °C. El resultado fue positivo y permitió amplificar ambos segmentos en los 20 pacientes con el mismo programa de PCR en el termociclador, en tanto para el segmento CYP2D6- β la temperatura de annealing seleccionada fue de 66°C. Estas condiciones fueron utilizadas

exitosamente para amplificar y secuenciar los tres segmentos génicos de los 20 pacientes incluidos en el estudio (Figura 12).

VI.3 Análisis de las secuencias

Las secuencias de los tres segmentos amplificadas de los 20 pacientes se alinearon con los segmentos de la secuencia de referencia, como muestran los ejemplos de las figuras 12-14, en donde las zonas homólogas de cada región en color rojo y las variaciones en color azul. Aunque al principio de cada secuencia forward y al final de cada secuencia reverse se observa un tramo de color azul, este es un artefacto esperado de la secuenciación debido a que la ADN polimerasa comete algunos errores de copiado al inicio de la polimerización, aunque estos errores no se toman en cuenta para la detección de los SNPs clínicamente relevantes que se encuentran en la parte de la secuencia que es copiada fielmente (Rodríguez y col., 2004).

VI.4 Análisis y frecuencia de los SNPs

Seis SNPs —rs1065852, rs1080995, rs1080996, rs1080997, rs1080998 y rs1081000— se encontraron en estado heterocigoto. Los más frecuentes, rs1080998 (42.1%), rs1080995 (40%) y rs1081000 (40%) corresponden al alelo *CYP2D6*41* que codifica una isoforma de CYP2D6 con actividad disminuida para el metabolismo de venlafaxina, indicando que la mayoría del grupo de estudio analizado presenta esta anomalía en el metabolismo del fármaco.

En estado homocigoto los SNPs más frecuentes fueron dos —rs1080996 (10%) y rs1081000 (10%)— ambos también características del alelo *CYP2D6*41*. En menor frecuencia se encontró rs1065852 (2%), SNP característico del alelo *CYP2D6*10*, que también codifica una isoforma con actividad disminuida para el metabolismo de venlafaxina.

La identificación de los SNPs y su estado homocigoto/heterocigoto permitió predecir el fenotipo metabolizador de venlafaxina mediante los criterios mostrados en el

Cuadro 18. En los individuos incluidos en el estudio predominó el genotipo *CYP2D6*1/*41*, que corresponde al fenotipo metabolizador intermedio, es decir, presentan una ligera disminución en la capacidad de metabolizar venlafaxina, con una frecuencia de 46.2%.

El análisis global mostró una prevalencia del 30.8% para el fenotipo normal (oficialmente llamado extensivo) y del 69.2% para el fenotipo metabolizador intermedio. Este hallazgo indica que en caso de recibir tratamiento con venlafaxina, más de dos tercios de los sujetos incluidos requerirían ajustar la dosis del medicamento para prevenir sus efectos adversos ya que la dosis administrada normalmente podría generarles la presencia de estos dado que hay una alteración en su capacidad de metabolizar el fármaco (Novelli, 2010; Sun & Zhang, 2014).

Nuestros resultados sugieren que la mayoría de la población podría tener un fenotipo metabolizador intermedio dado que se realizó un análisis con una población aleatoria sin segregar por características o grupos específicos, por lo que se espera que si se realiza un estudio más grande se observe el mismo comportamiento, si bien no podemos confirmarlo dado que el pequeño tamaño de la muestra no permite hacer esta generalización, sí sirve para validar el método desarrollado en este trabajo para identificar los polimorfismos clínicamente relevantes del gen *CYP2D6*. Sin embargo, nuestro estudio sugiere que debe llevarse a cabo un estudio farmacogenético empleando el método desarrollado en este trabajo de tesis con un grupo poblacional más amplio y representativo para determinar los genotipos y fenotipos en diversas poblaciones y regiones de México.

VII. CONCLUSIONES

1. Las parejas de oligonucleótidos diseñadas permiten obtener los tres amplicones del gen *CYP2D6* (*CYP2D6-α* de 393 pb, *CYP2D6-β* de 1039 pb, *CYP2D6-γ* de 689 pb) que contienen los SNPs clínicamente relevantes para el metabolismo de venlafaxina.
2. Las concentraciones de $MgCl_2$ y las temperaturas de annealing para generar los tres amplicones puros son: 1) *CYP2D6-α*: 2.5 mM, 61°C, 2) *CYP2D6-β*: mM, 66°C, 3) *CYP2D6-γ*: 1.5 mM, 61°C.
3. La distribución de los alelos de *CYP2D6* entre los 20 individuos incluidos en el estudio es la siguiente:
 - a. *CYP2D6*1* en 19 individuos; en cuatro en estado homocigoto, en 15 en estado heterocigoto.
 - b. *CYP2D6*10* en tres individuos; en dos en estado heterocigoto, en uno en estado homocigoto.
 - c. *CYP2D6*41* en seis individuos, en todos en estado heterocigoto.
 - d. *CYP2D6*10* en tres individuos; en dos en estado heterocigoto y en uno en estado homocigoto.
4. Los cuatro genotipos encontrados y los fenotipos correspondientes predichos por la distribución de los alelos, son:
 - a. Genotipo **1/*1* y fenotipo normal en cuatro individuos (30.8%)
 - b. Genotipo **1/*10* y fenotipo intermedio en dos individuos (15.4%)
 - c. Genotipo **1/*10* y fenotipo intermedio en dos individuos (15.4%)
 - d. Genotipo **1/*41* y fenotipo intermedio en seis individuos (46.2%)
 - e. Genotipo **1/*10* y fenotipo intermedio en dos individuos (15.4%)
5. Los dos fenotipos predichos entre los sujetos incluidos son intermedio y normal, con predominio del intermedio (18/20 = 90%).
6. El método desarrollado en este trabajo podrá emplearse para determinar el genotipo *CYP2D6* y el fenotipo metabolizador correspondiente y ajustar la dosis de venlafaxina en pacientes con trastorno depresivo mayor.

VIII. REFERENCIAS

APA. American psychiatric association: diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5ta Edición, Arlington, VA, New School Library, **2013**:155-189.

Arredondo, P. La reacción en cadena de la polimerasa. PCR: un impacto reciente en la biología molecular. *Balería de educación bioquímica*, **1993**:3–14.

Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Geddes, J. R., Higgins, J. P., Churchill, R., Barbui, C. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*, **2009**;373:746–758.

Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, **1998**;16:10881–10890.

Ereshfsky, L., & Dugan, D. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics, and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depress Anxiety*, **2000**;12:30–44.

Garcia, S., Schuh, M., Cheema, A., Atwal, H., & Atwal, P. S. Palpitations and Asthenia Associated with Venlafaxine in a CYP2D6 Poor Metabolizer and CYP2C19 Intermediate Metabolizer. *Case Rep Genet*, **2017**;2017:1-4

Howell, S. R., Husbands, G. E., Scatina, J. A., & Sisenwine, S. F. Metabolic disposition of 14C-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. *Xenobiotica*, **1993**;23:349–359.

INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial para la prevención del suicidio, Reporte INEGI, **2017**:1-10.

INEGI. (2018). Salud mental. [serie en internet], **2017**, [consultado 2018 octubre 15]:[aprox 2 pp]disponible en <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/salud/>.

Linde, K., Kriston, L., Rucker, G., Jamil, S., Schumann, I., Meissner, K., Schneider, A. Efficacy and acceptability of pharmacological treatments for depressive disorders

in primary care: systematic review and network meta-analysis. *Ann Fam Med*, **2015**;13:69–79.

Luzzatto, L., & Seneca, E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *British Journal of Haematology*, **2014**;164:469–480.

Martinez-Idarraga, A., Riveros-Barrera, I., Sanchez, R., Jaramillo, L. E., Calvo-Gomez, J. M., & Yunis-Londono, J. J. Characterisation of three polymorphisms of the tryptophan hydroxylase 2 gene in a sample of Colombian population with major depressive disorder. *Rev Colomb Psiquiatr*, **2017**;46:22–30.

MFMER, Mayo Foundation for Medical Research. Terapia electroconvulsiva. Test and procedures [serie en internet] **1998** [Consultado 2018 noviembre 11]:[aprox 2pp]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/electroconvulsive-therapy/about/pac-20393894?p=1>

Novelli, G. Personalized genomic medicine. *Internal and Emergency Medicine*, **2010**;5:81–90.

OMS. Día mundial de la salud mental 2017 – la salud mental en el lugar de trabajo. Salud mental OMS [serie en internet] **2017** [Consultado 2018 octubre 15]:[aprox. 2pp]. Disponible en: http://www.who.int/mental_health/world-mental-health-day/2017/es/

Otsuka, H. CYP2D6 cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6: Homo sapiens (human). GeneID, [serie en internet] **1975** [Consultado 2018 octubre 15];1565:[aprox. 4pp]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565>.

Otte, C. Major depressive disorder. *Nature Reviews , Disease Primers*, **2016**;2:1–20.

Rodríguez Martínez, J. M., & Martínez, J. M. R. Secuenciación de genomas. *Arbor*, **2004**;698:285–310.

Sangkuhl, K., Stingl, J. C., Turpeinen, M., Altman, R. B., & Klein, T. E. PharmGKB summary: venlafaxine pathway. *Pharmacogenet Genomics*, **2014**;24:62–72.

Shams, M. E. E., Arneth, B., Hiemke, C., Dragicevic, A., Müller, M. J., Kaiser, R., Härtter, S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **2006**;31:493–502.

Sun, X., & Zhang, J. Identification of putative pathogenic SNPs implied in schizophrenia-associated miRNAs. *BMC Bioinformatics*, **2014**;15:1-9.

Vogenberg, F. R., Isaacson Barash, C., & Pursel, M. Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, **2010**;35:560–576.

Wang, Z.-H., Zhan, Y.-Y., Li, Y.-X., Yang, C.-C., Cai, J., Dai, D.-P., ... Cai, J.-P. Effects of 24 CYP2D6 Variants Found in the Chinese Population on the Metabolism of Risperidone. *Pharmacology*, **2015**;96:290–295.

Wijnen, P. A., Limantoro, I., Drent, M., Bekers, O., Kuijpers, P. M., & Koek, G. H. Depressive effect of an antidepressant: therapeutic failure of venlafaxine in a case lacking CYP2D6 activity. *Ann Clin Biochem*, **2009**;46:527–530.

Zhan, Y. Y., Liang, B. Q., Wang, H., Wang, Z. H., Weng, Q. H., Dai, D. P., ... Hu, G. X. Effect of CYP2D6 variants on venlafaxine metabolism in vitro. *Xenobiotica*, **2016**;46:424–429.

Zhou, S. F. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet*, **2009**;48:689–723.