

**Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas**

**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO ÚNICO  
(SNP'S), DEL CITOCROMO P450, CYP2C9\*2 Y CYP2C19\*2 Y \*3, EN PACIENTES  
EPILÉPTICOS**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Valdivia Candia, Carla Fanny**

Para optar el Título Profesional de:

**Ingeniera Biotecnóloga**

Asesor: Ing. Carpio Carpio, José Miguel

**AREQUIPA-PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000037474

N° Trámite en Fac. 356-2017  
Fecha Recep. Fac. 18-08-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: VALDIVIA CANDIA, Carla Fanny

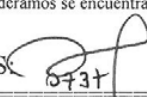
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"IDENTIFICACION DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (SNP's), DEL CITOCROMO P450, CYP2C9\*2 Y \*3 Y CYP2C19\*2 Y \*3, EN PACIENTES EPILEPTICOS RESISTENTES AL TRATAMIENTO"

DICTAMINADORES: Blgo. Carlos Paz Aliaga 2) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "IDENTIFICACION D ELOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (SNP's), DE CITOCROMO P450, CYP2C9\*2 Y \*3 Y CYP2C19\*2 Y \*3, EN PACIENTES EPILEPTICOS" después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS  (Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA 11/09/2017

ASESOR: Ing. José Miguel Carpio Carpio

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "IDENTIFICACION DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (SNP'S), DEL CITOCROMO P450, CY6P2C9\*2 Y CYP2C19\*2 Y \*3, PACIENTES EPILEPTICOS", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA 

FECHA 01/10/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
- 2) Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga
- 3) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "IDENTIFICACION DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (SNP'S), DEL CITOCROMO P450, CYP2C9\*2 Y CYP2C19\*2 Y \*3, EN PACIENTES EPILEPTICOS" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA 

(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 19-10-18

JURADOS: PRESIDENTE Dr. José Villanueva Salas  
VOCAL Blgo. Juan Paz Aliaga  
SECRETARIO Ing. Cinthia Córdova Barrios

FECHA 30/10/18

HORA 19:00

LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO 

FECHA 23/10/18

## DEDICATORIA

*A mi familia, que siempre ha estado presente con su apoyo incondicional y consejo, mis padres Bertha y Félix y mi hermana Anel, porque son mi sostén y fuente de motivación en cada paso dado, ninguna palabra bastará para describir mi amor y gratitud para ustedes.*



## AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme cada día con sus muestras de infinita bondad y amor, reflejadas hoy, en la oportunidad de concluir esta etapa en mi desarrollo profesional al lado de mi familia y amigos.

Al Dr. José Villanueva Salas, por la confianza y la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, que me ha llenado de experiencia y aprendizaje.

A mi asesor el Ing. José Carpio Carpio, por el apoyo y tiempo brindado durante el desarrollo de este proceso de tesis.

Al Programa FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico) que financió la presente tesis mediante el proyecto 097-2015.

Al laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar la presente Tesis que forma parte de los trabajos de investigación del área de Neurociencia.

A Calixto, siempre oportuno.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN .....	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIV
HIPÓTESIS.....	XVI
OBJETIVOS .....	XVII
OBJETIVO GENERAL .....	XVII
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	XVII
CAPÍTULO I .....	1
1. MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 EPILÉPSIA .....	1
1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE EPILEPSIA.....	2
1.3 ETIOLOGÍA .....	3
1.4 TRATAMIENTO .....	4
1.5 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS .....	7
1.6 CITOCROMO P450.....	8
1.7 IMPLICANCIAS GENÉTICAS .....	12
1.8 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LOS GENES CYP2C9 Y CYP2C19.....	13
1.9 IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP .....	14
CAPÍTULO II .....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN .....	16
2.2 MATERIALES.....	16
2.2.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	16
2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....	16
2.2.3 REACTIVOS.....	16

2.2.4 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN .....	16
2.2.5 OTROS MATERIALES.....	17
2.3 METODOLOGÍA .....	17
2.3.1 SELECCIÓN Y TOMA DE MUESTRA DE PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL.....	17
2.3.2 EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DEL ADN GENÓMICO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	19
2.3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE FASE SÓLIDA CON COLUMNAS DE SÍLICA.....	19
2.3.2.2 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN (MG/ML) DEL ADN GENÓMICO EXTRAÍDO POR FLUOROMETRÍA.....	20
2.3.2.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN GENÓMICO EXTRAÍDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	21
2.3.2.4 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO EXTRAÍDO POR ELECTROFORESIS .....	22
2.3.3 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CYP2C9 *2 Y CYP2C19 *2 Y *3 POR PCR-RFLP.....	23
2.3.3.1 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE INTERÉS MEDIANTE PCR.....	23
2.3.3.2 EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS:	26
2.3.3.3 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y EVALUACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	26
2.3.4 REPORTE Y ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL	28
2.3.5 RELACIÓN DEL ESTADO POLIMÓRFICO DE LOS GENES DEL CITOCROMO P450, CYP2C9*2 Y CYP2C19*2 Y *3, CON OTRAS POBLACIONES.....	28
CAPÍTULO III.....	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
3.1 SELECCIÓN Y TOMA DE MUESTRA DE PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL.....	29
3.2 EVALUACIÓN DE ADN GENOMICO EXTRAÍDO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS	31

3.3 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CYP2C9*2, CYP2C19*2 Y CYP2C19*3 POR PCR-RFLP .....	34
3.4 REPORTE Y ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL .....	45
3.5 RELACIÓN DEL ESTADO POLIMÓRFICO DE LOS GENES DEL CITOCROMO P450, CYP2C9*2 Y CYP2C19*2 Y *3 CON OTRAS POBLACIONES .....	51
CAPÍTULO IV .....	53
4. CONCLUSIONES .....	53
CAPÍTULO V .....	55
5. RECOMENDACIONES .....	55
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
7. ANEXOS .....	63
ANEXO 1. PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA .....	63
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CELULAS SANGUÍNEAS .....	64
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE ESTANDARES Y LECTURA DE CONTRACCIÓN DE ADN POR FLUOROMETRÍA .....	66
ANEXO 4. PROTOCOLO PARA ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO .....	67
ANEXO 5. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y SEGUIMIENTO A PACIENTES .....	68
ANEXO 6. CONSENTIMIENTO LIBRE INFORMADO .....	70
ANEXO 7. CONCENTRACIÓN DE ADN GENÓMICO EN PACIENTES EPILÉPTICOS .....	74
ANEXO 8. CONCENTRACIÓN DE ADN GENOMICO VOLUNTARIOS CONTROL ..	75
ANEXO 9. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN GENÓMICO DE PACIENTES EPILÉPTICOS .....	76
ANEXO 10. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN GENÓMICO DE VOLUNTARIOS CONTROL .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers específicos para la amplificación de los genes CYP2C9 y CYP2C19.....	23
Tabla 2. Preparación de la reacción de PCR para los genes CYP2C9 y CYP2C19 .....	25
Tabla 3. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C9*2 .....	25
Tabla 4. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C19*2 .....	25
Tabla 5. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C19*3 .....	26
Tabla 6. Descripción demográfica de la población analizada.....	45
Tabla 7. Descripción de la distribución genotípica por sexo para los genes CYP2C9*2, CYP2C19*2 y CYP2C19*3 en pacientes epilépticos y voluntarios control .....	47
Tabla 8. Análisis de frecuencia genotípica y alélica en Pacientes Epilépticos y Voluntarios Control .....	48
Tabla 9. Análisis de frecuencia genotípica y alélica en Pacientes Epilépticos Farmacorresistentes y Farmacorrespondedores .....	49
Tabla 10. Comparación de las frecuencias alélicas de CYP2C9 y CYP2C19 en distintas poblaciones. ....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del CYP450 en membranas microsomales .....	10
Figura 2. Ciclo catalítico del Citocromo P450.....	11
Figura 3. Extracción de sangre periférica por venopunción y colección en tubos con anticoagulante EDTA.....	19
Figura 4. Materiales para la extracción de DNA por columnas de sílica .....	20
Figura 5. Materiales para la medición de la concentración de ADN.....	21
Figura 6. Materiales utilizados para la evaluación de integridad del ADN genómico extraído. ....	22
Figura 7. Disposición de la cabina de Pre-PCR y preparación de reacción.....	24
Figura 8. Enzimas de restricción utilizadas Sau96I, SmaI y BamHI.....	27
Figura 9. Descripción porcentual del estado de Diagnóstico de Epilepsia en la población de estudio .....	30
Figura 10. ADN genómico extraído de Pacientes Epilépticos.....	32
Figura 11. ADN genómico extraído de Voluntarios Control.....	33
Figura 12. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C9*2 .....	34
Figura 13. Amplificación genética del gen CYP2C9*2 en Pacientes Epilépticos.....	34
Figura 14. Amplificación genética del gen CYP2C9*2 en Voluntarios Control.....	35
Figura 15. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C19*2 .....	35
Figura 16. Amplificación genética del gen CYP2C19*2 en Pacientes Epilépticos.....	35
Figura 17. Amplificación genética del gen CYP2C19*2 en Voluntarios Control.....	36
Figura 18. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C19*3 .....	36
Figura 19. Amplificación genética del gen CYP2C19*3 en Pacientes Epilépticos.....	36
Figura 20. Amplificación genética del gen CYP2C19*3 en Voluntarios Control.....	37
Figura 21. Digestión Virtual del gen CYP2C9*2 con la plataforma en línea Restriction Mapper. Genotipo homocigoto silvestre .....	37
Figura 22. Digestión Virtual del gen CYP2C9*2 con la plataforma en línea Restriction Mapper. Genotipo homocigoto polimórfico.....	38
Figura 23. Digestión enzimática para el gen CYP2C9*2 en Pacientes Epilépticos .....	39
Figura 24. Digestión enzimática para el gen CYP2C9*2 en Voluntarios Control .....	39
Figura 25. Digestión Virtual del gen CYP2C19*2 con la plataforma en línea Restriction Mapper. Genotipo homocigoto silvestre.....	40

Figura 26. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*2 en Pacientes Epilépticos. ....41

Figura 27. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*2 en Voluntarios Control .....41

Figura 28. Digestión Virtual del gen CYP2C19\*3 con la plataforma en línea Restriction Mapper. Genotipo homocigoto silvestre.....42

Figura 29. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*3 en Pacientes Epilépticos .....43

Figura 30. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*3 en Voluntarios Control. ....43

Figura 31. Distribución genotípica de Pacientes epilépticos frente a Voluntarios Control .....44



## RESUMEN

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) constituyen una herramienta importante en la biotecnología y en especial en la biotecnología médica, particularmente en el estudio de la medicina personalizada. La variabilidad entre individuos en la respuesta a fármacos, es un grave problema en la práctica clínica y su desarrollo, pudiendo conducir a un fracaso terapéutico o efectos adversos. El citocromo P450 con su subfamilia CYP2C, relacionada al metabolismo de fármacos, se ha vinculado a la resistencia frente al tratamiento de la epilepsia, por lo que el objetivo del presente trabajo fue identificar y reportar polimorfismos de nucleótido único (SNPs), así como la frecuencia alélica en una población representativa de personas tanto con padecimiento de la enfermedad; como sanas, permitiendo conocer el estado polimórfico para poder así contribuir con el éxito del tratamiento; para esto, 80 pacientes epilépticos, entre los 15 y 80 años de edad, atendidos por consulta externa en el servicio de Neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza de Arequipa fueron reclutados, además se incluyó un grupo control con 80 voluntarios no relacionados a la enfermedad, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental de la Universidad Católica de Santa María, donde se analizó la genotipificación de CYP2C9 y CYP2C19, para lo cual se realizó la extracción de ADN genómico de células sanguíneas empleando el método de columnas de sílica, la evaluación del producto de extracción comprendió de su cuantificación por fluorometría, donde se obtuvo en promedio 37.86 ng/ $\mu$ L de ADN

genómico, para las muestras de pacientes epilépticos, y un promedio de 45.03 ng/ $\mu$ L para las muestras de voluntarios control, la calidad del ADN genómico se evaluó por espectrofotometría con la relación A260:A280 nm, donde se obtuvo para los pacientes epilépticos una relación promedio de 1.85, y para voluntarios control el promedio de esta misma relación fue de 1.86, finalmente la integridad del ADN genómico extraído se evidenció a través de la evaluación electroforética, cumpliendo de manera óptima con las condiciones para el análisis molecular; a su vez la identificación de polimorfismos se analizó mediante la amplificación de la secuencia de interés y su posterior digestión con las enzimas de restricción *Sau96I* (CYP2C9\*2), *SmaI* (CYP2C19\*2), y *BamHI* (CYP2C19\*3), este procedimiento en dos pasos comprende la técnica de PCR-RFLP que tras el análisis de todas las muestras se pudo concluir que la presencia de las variantes polimórficas en los genotipos y alelos pertenecientes a CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, de pacientes epilépticos frente a los voluntarios control no presentan diferencia significativa, como tampoco la manifiesta una comparación intergrupala en cuanto a pacientes epilépticos farmacorresistentes y farmacorrespondedores, sin embargo se observó un efecto protector ante la presencia polimórfica de CYP2C9 y CYP2C19, que a pesar de no ser significativo en el presente estudio, también fue reportado por otros, sugiriendo favorecer a no desarrollar resistencia al tratamiento, por su parte el análisis poblacional de distribución genotípica evaluado mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg señaló encontrarse en equilibrio para el grupo de voluntarios control, pero fuera de este, para el grupo de pacientes epilépticos lo que se podría interpretar como un cambio evolutivo en la población estudiada. Finalmente en cuanto a la relación del estado polimórfico de los genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, se identificó que sus frecuencias alélicas se encuentran dentro del rango reportado en poblaciones Chinas, Japonesas, y Mexicanas.

Palabras clave: CYP2C9, CYP2C19, Polimorfismo de nucleótido único (SNPs), PCR-RFLP

## ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNP's) refer to an important tool in biotechnology, in particular in medical biotechnology, especially in the study of personalized medicine. The variability between individuals in the response to drugs is a serious problem in clinical practice and its development, which can lead to therapeutic failure or adverse effects. Cytochrome P450 with its CYP2C subfamily, related to the metabolism of drugs, has been related to resistance to the treatment of epilepsy, the objective of this work is the identification and polymorphisms of the single nucleotide (SNP), as well as the allelic frequency in a representative population of people with both the disease's disease; As healthy, use knowing the state. for this, 80 epileptic patients, between 15 and 80 years of age, attended by external consultation in the Neurology service of the Hospital Regional Honorio Delgado Espinosa of Arequipa were recruited, also included a control group with 80 volunteers not related to the disease The samples were processed in the Laboratory of Molecular Biology and Experimental Pharmacology of the Catholic University of Santa Maria, where the genotyping of CYP2C9 and CYP2C19 was analyzed, for which the extraction of the genomic DNA of the cells is verified. of silica, the evaluation of the product of the extraction of the quantification by fluorometry, where an average of 37.86 ng /  $\mu\text{L}$  of genomic DNA was obtained, for the samples of epileptic patients, and an average of 45.03 ng /  $\mu\text{L}$  for the control samples of safety, the quality of the genomic DNA is evaluated by spectrophotometry with the relation A260: A280 nm, don The information on the state of the extracted generic blood was also evidenced through the electrophoretic evaluation, fulfilling in a correct way with the conditions. for molecular analysis; this time the identification of polymorphisms was analyzed by amplifying the sequence of interest and its subsequent digestion with the restriction enzymes Sau96I (CYP2C9 \* 2), SmaI (CYP2C19 \* 2), and BamHI CYP2C19 \* 3), this is in two steps includes the PCR-RFLP technique that after the analysis of all the samples we can find the presence of the polymorphic variants in the genotypes and alleles belonging to CYP2C9 \* 2, CYP2C19 \* 2 and CYP2C19 \* 3, of the epileptic patients in front of a voluntary control does not differentiate significant difference, nor is an intergroup comparison shared in terms of drug-resistant epileptic patients and pharmacoresponders, however it is a protective effect in the presence of polymeric CYP2C9 and CYP2C19, which present study, was also reported by others, suggesting favoring not developing resistance to treatment, on the other hand the population analysis The genotypic distribution was evaluated through the Hardy-Weinberg equilibrium. In the group of volunteers, control, but outside, the group of epileptic patients, which can be

interpreted as an evolutionary change in the population studied. Finally, in relation to the status of the genes CYP2C9 \* 2, CYP2C19 \* 2 and CYP2C19 \* 3, their allelic frequencies are found in the range reported in the Chinese, Japanese and Mexican populations.

Keywords: CYP2C9, CYP2C19, Single nucleotide polymorphism (SNPs), PCR-RFLP



## INTRODUCCIÓN

De los principales trastornos neurológicos en todo el mundo, la epilepsia se sitúa entre los de mayor atención, ya que alrededor de 50 millones de personas de todas las edades, la padece; es por ello que el desarrollo de su tratamiento tiene como principal objetivo la libertad de convulsiones, sin efectos adversos sobre la calidad de vida del paciente. Según el MINSA, en 2008 se atendió a un total de 41,442 pacientes por epilepsia, de ellos se estableció un 30.36% de pacientes con epilepsia del tipo no especificado, y en el 74% de pacientes no se especificó el tipo de crisis, lo que tiene implicancias en el tratamiento, porque aquellos medicamentos que son buenas para un tipo de crisis no lo son para otras, el informe reconoce que la epilepsia es un trastorno neurológico frecuente en nuestro país; así mismo, dentro del registro de la ciudad de Arequipa se contó con un total de 2,522 pacientes; este reporte plantea que no se tiene un diagnóstico esclarecido, dada la falta de medios auxiliares para llevarlo a cabo; es decir, existe la necesidad de realizar un desarrollo de nuevas técnicas. Aproximadamente dos tercios de las personas con epilepsia pueden quedar libres de convulsiones con los fármacos antiepilépticos disponibles, pero la respuesta a las convulsiones y la susceptibilidad a efectos contraproducentes, varía mucho entre individuos, estas variaciones se pueden suscitar debido a los factores genéticos, siendo el principal impacto de estos factores la relación con el control de la variabilidad en el metabolismo. Dentro de este factor genético, el impacto con mayor relevancia clínica, se conoce como la presencia de polimorfismos genéticos, que afectan los genes que codifican a enzimas de la familia del Citocromo P450 implicadas en el metabolismo de varios de estos fármacos antiepilépticos (1) (2).

Mediante el uso de la información genética es posible identificar los cambios en el funcionamiento de diversos genes entre los individuos así como los mecanismos que los rigen y que son los responsables de las diferencias en las respuestas a los fármacos. La identificación de la variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento de la epilepsia, puede permitir la individualización del mismo, con la intención de maximizar su eficacia, minimizar el riesgo, y sugerir la modificación de las dosis terapéuticas, es así que el descubrimiento de polimorfismos genéticos en el metabolismo de fármacos ha contribuido de manera significativa a la comprensión de la variabilidad interindividual en las relaciones y la respuesta a los fármacos (3).

La farmacogenética, estudia el efecto de la variabilidad genética de un individuo en respuesta a determinado fármaco, siendo los polimorfismos de nucleótido único, que resultan de la

sustitución, delección o inserción de una sola base nucleotídica en el ADN, las formas más comunes de variaciones de la secuencia de genes y se ha descrito que su presencia puede afectar tanto la farmacocinética como la farmacodinámica de los fármacos antiepilépticos; un polimorfismo genético puede alterar el código de un triplete de bases, y esto puede resultar en un cambio de la secuencia de aminoácidos en la proteína codificada, o también ocasionar la presencia de un codón de paro prematuro o alteraciones en el proceso de empalme del ARN, lo que, a su vez, ocasiona que la proteína resultante tenga alterada su estructura y, en consecuencia, su función, es así que una proteína disfuncional puede afectar el metabolismo de un fármaco en diferentes niveles, como la absorción, distribución, acción, metabolismo (conversión a su metabolito activo) y depuración (ruta de inactivación y/o eliminación) (4).

Se sabe que las enzimas de la familia del citocromo P450 son responsables de la oxidación de aproximadamente el 90% de los fármacos utilizados actualmente, con las variantes alélicas 2 y 3 correspondientes a los genes CYP2C9 y CYP2C19, de los más estudiados. Estudios iniciales en el metabolismo de la fenitoína, conocido fármaco antiepiléptico, demostraron el rol predominante del citocromo P450 de carácter polimórfico para los genes CYP2C9 y CYP2C19; afectando en su capacidad metabolizadora del fármaco, produciendo fenotipos denominados como metabolizadores lentos (ML) en aproximadamente el 10% de caucásicos; demostrando a través de estudios de población que los polimorfismos genéticos para ambos genes, juegan un rol importante en la variabilidad metabólica de la fenitoína; por lo que el desarrollo del estudio dirigido a la dinámica mutacional en determinadas poblaciones, se vio con el fin de proporcionar un diagnóstico más acertado y una medicación más dirigida para la enfermedad (5).

La técnica utilizada para este estudio es conocida como PCR-RFLP, por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment length Polymorphism*, que básicamente se basa en la identificación de las diferencias en la secuencia de un fragmento de ADN, previamente amplificado por una PCR convencional; mediante la digestión con endonucleasas que proporcionarán fragmentos de distinta longitud al identificar el sitio de restricción específico. Proporcionando así la información de presencia o ausencia del nucleótido ancestral o silvestre, para dicha secuencia, y por ende su identificación en la variante alélica. La mayoría de los marcadores RFLP son co-dominantes, lo que significa que se podrá detectar ambos alelos en la muestra distinguiendo el carácter homocigoto o heterocigoto para esta, la visualización de los resultados se da mediante una corrida electroforética en geles de agarosa, confirmando a esta técnica idónea, en cuanto a manejo y accesibilidad (6,7).

## HIPÓTESIS

Dado que la presencia de los polimorfismos en el citocromo P450, CYP2C9 y CYP2C19 se ha vinculado a la resistencia al metabolismo de los fármacos empleados en el tratamiento de la epilepsia, es probable que estos polimorfismos estén presentes también en pacientes epilépticos peruanos que presenten resistencia a los fármacos antiepilépticos.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Identificar los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP's), del Citocromo P450, CYP2C9\*2 y CYP2C19\*2 y \*3, en pacientes epilépticos

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración, calidad e integridad del ADN genómico extraído de células sanguíneas.
2. Detectar los polimorfismos de los genes correspondientes al Citocromo P450, CYP2C9 y CYP2C19; empleando la técnica PCR-RFLP
3. Reportar y analizar la frecuencia alélica y genotípica de CYP2C9\*2 y CYP2C19\*2 y \*3 en la población estudiada.
4. Relacionar el estado polimórfico de los genes del citocromo P450, CYP2C9\*2 y CYP2C19\*2 y \*3, con otras poblaciones.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 EPILÉPSIA

Se ha reportado a la epilepsia como uno de los trastornos neurológicos más comunes, que afecta aproximadamente de 50 a 65 millones de personas alrededor el mundo, a pesar que puede ser tratada satisfactoriamente con la mediación diaria adecuada, países de medianos a bajos ingresos poseen las mayores estimaciones para su diagnóstico, ya sea por no llevar adecuadamente el tratamiento, inaccesibilidad a la atención, costo, disponibilidad de fármacos, o por incidencia y susceptibilidad a accidentes (8,9).

La definición clínica operativa (práctica) de epilepsia según la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) (10), por sus siglas en inglés, la señala como:

“Una enfermedad cerebral que se define por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con más de 24 horas de separación.
- Una crisis no provocada (o refleja) y una probabilidad de presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes similar al riesgo general de recurrencia (al menos el 60 %) tras la aparición de dos crisis no provocadas.
- Se considera resuelta si el paciente lleva 10 años sin presentar crisis y no ha recibido fármacos en los últimos 5 años.”

Esta definición deja en claro la diferencia entre crisis convulsivas no provocadas (espontaneas) y provocadas, que se deben a factores que no están ligados o asociados a una recurrencia perdurable, como accidentes cerebrovasculares o un traumatismo encéfalo craneano; por lo tanto no calificarían dentro de un diagnóstico para epilepsia (8).

Fisiológicamente estas crisis convulsivas surgen como descargas neuronales excesivas, bruscas e hipersincrónicas en un grupo de neuronas; el desequilibrio entre neurotransmisores tanto excitatorios (aspartato y glutamato) como inhibitorios (ácido gama amino butírico-GABA), en este grupo de neuronas, se ve reflejado en el impulso nervioso, provocando un potencial de acción anormal (2,11).

En condiciones normales cuando un estímulo llega a una neurona produce un cambio electroquímico, provocando su despolarización, este flujo iónico producido en los canales de sodio y potasio, es controlado por neurotransmisores; en el caso de una neurona pre sináptica será el glutamato, que es el mayor neurotransmisor excitatorio, el cual, al liberarse al espacio sináptico e interactuar con los receptores de la neurona post sináptica, (N-metil-D-aspartato NMDA), incitará la apertura de los canales de sodio y calcio en esta última y así su despolarización para dar lugar a un potencial de acción que continuará a través de la célula; por otro lado existen también impulsos inhibitorios en neuronas inhibitorias, que al ser despolarizadas como las neuronas presinápticas, liberan al neurotransmisor GABA, que al entrar en contacto con los receptores de membrana específicos (GABA<sub>a</sub>) en la membrana de la neurona postsináptica, provocará la apertura de los canales de cloro en esta última, neutralizando así el efecto excitatorio antes descrito, e inhibiendo el impulso eléctrico. En la epilepsia el grupo de neuronas anormales, presenta un cambio de despolarización paroxístico, es decir brusco e intenso, provocando que el impulso eléctrico se envíe reiteradamente de esta forma, ya sea por exceso de excitación o déficit de inhibición. Los pacientes con epilepsia pueden presentar alteración de concentración iónica intra o extracelular, en la despolarización de la membrana, y/o disminución en la inhibición de la señal eléctrica o aumento excesivo en su excitación (2,8,12).

## 1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE EPILEPSIA

La más reciente actualización de clasificación para los tipos de epilepsia según la ILAE (13), ha tenido lugar luego de la última revalidación de 1989; asistiendo a una mayor comprensión de la enfermedad, ya que está designada en multinivel, permitiendo considerar los distintos ambientes clínicos, puesto que en el mundo se tienen escenarios distintos en cuestión de recursos disponibles para un diagnóstico adecuado y por consiguiente señalar su etiología. La clasificación de la epilepsia va de la mano, como punto de partida, con los tipos de crisis epilépticas, también conocidos como ataques convulsivos, distinguiéndose según su origen como: focal (que se originan en redes neuronales limitadas a un hemisferio), generalizado (que surge en un punto de compromiso con las redes neuronales distribuidas bilateralmente) y desconocido (que evidencia insuficiencia de información para asegurar que es focal, generalizado o ambos); según el entorno clínico y la realidad de cada paciente, este es en algunos casos, el máximo nivel para el diagnóstico, ya que no se cuenta con información de estudios especializados que

proporcionen mayores indicios, como electroencefalogramas, resonancias magnéticas, tomografías o videos (13,14).

Las crisis epilépticas de origen focal, manifiestan tanto pérdida de consciencia como consciencia retenida, de todas formas su especificación es opcional, la clasificación según el origen tiene una base anatómica, mientras que por el nivel de consciencia es de tipo comportamental; y cuando no se tiene conocimiento de estos se clasifica directamente por su manifestación motora. Se tiene entonces movimientos de tipo:

- Clónicos, es decir movimientos repetitivos
- Atónicos, que son la relajación completa de los músculos, ocasionando un desvanecimiento.
- Espasmos con grado de consciencia no especificado.
- Hipercinética, este nuevo término, comprende a movimientos agitados de golpeo o pedaleo.
- Mioclónicos, contracciones irregulares breves de manos y hombros.
- Tónicos, que manifiestan rigidez muscular de las extremidades.
- Autonómicos, no motores
- Comportamiento de ausencia que son de carácter cognitivo, emocional, sensorial, como miedo o angustia.

Las crisis de origen generalizado, no manifiestan consideraciones de consciencia, pero si motoras, de forma tónico-clónica, clónica, tónica, mioclónica, mioclónica- tónico-clónica, mioclónica –atónica, atónica, y espasmos, así como no motora; por último el origen desconocido señala la presencia de crisis tónico-clónicas, espasmos epilépticos y comportamiento de ausencia (14,15).

Cuando el trastorno epiléptico esta esclarecido por el conjunto de síntomas y signos característicos, como la edad de aparición de los ataques convulsivos, el tipo de convulsión, las anormalidades en los reportes electro encefálicos, respuesta al tratamiento y pronostico a largo plazo, se puede establecer la medicación adecuada tanto como su respuesta esperada (15).

### 1.3 ETIOLOGÍA

La epilepsia con causas conocidas se denomina en términos generales como epilepsia secundaria o sintomática, e idiopática, cuando no se tiene conocimiento suficiente para

distinguir su origen. Haciendo énfasis en aquellas causas que presentan implicancias para el tratamiento, en primera instancia, se sugiere investigar a nivel de neuroimágenes (resonancia magnética), ya que una anomalía estructural es visible a través de ellas; para poder decidir si existe una etiología estructural, teniendo en cuenta que estas pueden ser tratadas a través de una intervención quirúrgica, conjuntamente a una evaluación de electroencefalograma, que permite suponer que la anormalidad que se evidencia en la imagen causa las convulsiones, y pudo ser adquirida, como daño cerebral por lesiones prenatales o perinatales (asfixia o traumatismos durante el parto o al nacer); malformaciones congénitas o alteraciones genéticas con malformaciones cerebrales asociadas, así como anomalías a nivel de los canales iónicos, afectando directamente el tratamiento; traumatismos encéfalo craneanos graves o accidentes cerebrovasculares que limitan la llegada del oxígeno al cerebro; se conoce también etiologías de tipo infecciosas cerebrales como las meningitis, encefalitis, tuberculosis, neurocisticercosis; debido también a algunos síndromes o malformaciones genéticas, tumores cerebrales, como lo es el caso de convulsiones asociadas al lóbulo temporal mesial con esclerosis del hipocampo, esta condición provoca una pérdida de neuronas debido a que el tejido no se regenera, la mayoría de casos reporta agresión cerebral precoz en la infancia, con convulsiones febriles, meningoencefalitis, traumatismos craneoencefálicos o alteraciones en el desarrollo neuronal; así mismo se presenta la etiología metabólica, por desórdenes manifestados en cambios bioquímicos en el cuerpo como lo son las aminoacidopatías y la porfiria. Se tiene en consideración entonces que la epilepsia del paciente puede presentar más de una categoría etiológica (9,14).

#### **1.4 TRATAMIENTO**

El objetivo de los fármacos antiepilépticos (FAE) es el control y la consecuente atenuación de las crisis convulsivas, siendo la recurrencia de estas, entre periodos distantes de al menos 6 meses, sin embargo la respuesta a las dosis prescritas tienen poco efecto sobre el foco epiléptico, y esto se debe a la variabilidad de respuesta a la medicación atribuida por diversos factores, uno de ellos es su metabolismo, y las implicancias sobre este se deben a que en su gran mayoría los fármacos antiepilépticos presentan un estrecho rango terapéutico; este se denomina como la concentración del fármaco a la que se encuentra conferida la mejor respuesta terapéutica para un paciente en específico, consiguientemente, esta sería una referencia individual. Algunos individuos pueden alcanzar efectos terapéuticos beneficiosos con concentraciones plasmáticas fuera de los

límites de los rangos de referencia, y algunos pueden no presentar reacciones adversas, aun cuando se sobrepasan los límites tóxicos, mientras que otros pueden presentar síntomas de toxicidad con niveles inferiores a sus concentraciones plasmáticas. Básicamente el efecto de los fármacos antiepilépticos radica en evitar la expansión de la descarga a las células neuronales vecinas, actuando así sobre cuatro mecanismos específicos, como lo son; la inhibición de los canales de sodio, la inhibición de los canales de calcio, la promoción de la inhibición del GABA, y finalmente la inhibición de la excitación dada por el glutamato. El fenobarbital; ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico, es un medicamento sedante e hipnótico, que actúa inhibiendo al GABA y así aumentando las corrientes post-sinápticas, logrando que los canales de cloro permanezcan abiertos lo necesario para que el potencial de acción tenga un recorrido más normalizado, además también se reporta que puede disminuir en cierta medida, el potencial de acción dependiente de calcio, interviniendo de forma indirecta sobre la liberación de neurotransmisores en las descargas paroxísticas. Este fármaco no posee gran afinidad por las proteínas séricas a comparación de los otros, logrando el control en crisis neonatales, crisis febriles, tónico-clónicas generalizadas y crisis focales con generalización secundaria. En adultos, el fenobarbital es administrado una vez al día (por lo general en la noche), en dosis de 50 a 200 mg, los niveles plasmáticos terapéuticos efectivos oscilan entre 15 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (16,17).

La fenitoína, es absorbida en el intestino y se une ágilmente a proteínas plasmáticas, lo que permite su desplazamiento a través de membranas, alcanzando un máximo volumen de distribución en un periodo alrededor de 15 minutos tras la absorción; es metabolizado en el hígado bajo la forma de 5-(4'-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína, por el sistema enzimático P450, y en lo que respecta a su mecanismo de acción, resalta su capacidad para interferir en el transporte de sodio a través de la membrana neuronal, mediante la conductancia de este ion, contribuyendo así en la liberación de neurotransmisores, y controlando la propagación de descargas que puedan afectar a neuronas vecinas a las afectadas. Se ha registrado un nivel sérico terapéutico de 10 -20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que se asocia a un rango terapéutico estrecho, se ha visto además que presenta control positivo, sobre crisis focales y secundarias generalizadas y se prescribe conjuntamente a ácido valproico, carbamacepina o benzodiacepínicos, las dosis de estos últimos deben ser consideradas en aumento, ya que la fenitoína se caracteriza por presentar inducción enzimática, lo que podría aumentar el metabolismo de los fármacos administrados en conjunto (18).

Para que la carbamacepina pueda actuar debe ser primeramente biotransformada en su forma activa, conocida como carbamacepina-10,11-epóxido o epóxido-CBZ; esta biotransformación se da en el hígado por el sistema del ya mencionado P450, el compuesto biotransformado, puede atravesar con facilidad las membranas del cuerpo, debido a su alta liposubilidad, llegando así a su lugar de acción, su efecto al igual que la fenitoína, radica en la acción sobre los canales de sodio, reduciendo los potenciales de acción de alta frecuencia, además de actuar sobre la transmisión sináptica y los receptores de los neurotransmisores; produce su propia autoinducción por lo que desencadena en una progresiva disminución en sus niveles séricos, al aumentar su eliminación, sugiriendo aumentar la dosis hasta alcanzar una estabilidad de la concentración plasmática; ya que es metabolizada hepáticamente, cualquier alteración a este nivel, podría afectar directamente con su efectividad; su rango terapéutico se estima entre 4-8  $\mu\text{g/mL}$ ; y se recurre a su medicación en el caso de crisis parciales en adultos y niños con crisis secundarias generalizadas, y/o con manifestaciones cognitivas; su mayor desventaja es la ausencia de una formulación para uso parenteral (19).

En el caso del Ácido valproico, la mayoría de sus formulaciones son sales, como el valproato de sodio, valproato de magnesio y divalproato de sodio, por ello el ácido valproico es comúnmente llamado valproato; actúa aumentando los niveles del neurotransmisor inhibitorio GABA, acrecentando su síntesis, promoviendo su liberación, facilitando la acción sobre el receptor, e inhibiendo su degradación; es un FAE de primera elección, permitiendo tratar todos los tipos de crisis en epilepsias generalizadas primarias o idiopáticas, crisis de ausencias, tónico-clónico generalizadas o crisis mioclónicas, y también puede ser efectivo en crisis parciales con o sin generalización secundaria. El valproato posee una alta unión a proteínas, siendo la fracción libre, la que atraviesa la barrera hematoencefálica del cerebro y responsable de la acción antiepiléptica; y su metabolismo se da por la hidroxilación hepática en el sistema P450, en las mitocondrias de los hepatocitos, para finalmente conjugarse con el ácido D-glucorónico, y así ser posteriormente excretado en la orina; no es un fármaco de carácter autoinducible como la carbamacepina, y a su vez causa la disminución plasmática del fenobarbital por la competición a la unión de proteínas, en contraparte causa desordenes endocrinos, como anomalías menstruales, hiperglicemia, entre otros (16,20).

## 1.5 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Toda sustancia química ajena al organismo y que tiene la capacidad de ingresar al mismo, es conocida como un xenobiótico, estos pueden ser de origen natural o sintético, y nos encontramos expuestos diariamente a ellos, bajo esta esta premisa, los fármacos y en este caso, los fármacos antiepilépticos, lo son; como ya se mencionó, actúan a nivel del sistema nervioso central y generalmente son altamente liposolubles para poder actuar sobre su órgano diana que es el cerebro, por tratarse de sustancias altamente liposolubles, la mayoría de los FAEs no pueden ser eliminados por los riñones sin previa modificación, pues retornan al plasma en su paso por los túbulos renales; se hace necesaria dicha transformación en metabolitos solubles acuosos para facilitar la excreción urinaria que es llevada a cabo por el hígado (21).

El sistema enzimático hepático comprende dos subsistemas, uno constituido por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico, llamado sistema microsomal, responsable por la mayoría de las reacciones de metabolización; y otro no microsomal, en el citoplasma y en las organelas celulares y sistema mitocondrial; estos no pertenecen a las vías de metabolismo energético o intermedio y básicamente contribuyen con la supervivencia celular, ya que de no existir, los xenobioticos en el interior del organismo, tenderían a acumularse, provocando toxicidad y consecuentemente muerte celular; este proceso de neutralización y excreción, es denominado como reacciones de biotransformación y se han agrupado en dos fases; en la fase 1, los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo); en la fase 2 los metabolitos generados por las reacciones de la fase 1, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar, como el ácido glucorónico, ácido acético o el sulfato inorgánico, para lograr la formación de productos de conjugación que son rápidamente excretados por la bilis o riñones sin mayor inconveniente. Las enzimas de la fase 1 son capaces de transformar gran variedad de substratos y catalizar reacciones diversas; por su múltiple naturaleza, incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterases y amidasas hepáticas y plasmáticas (21,22).

## 1.6 CITOCROMO P450

El citocromo P450, también denominado como CYP450, es reconocido como el miembro más destacado y extensamente estudiado del grupo de enzimas de fase 1; y no se trata de una sola enzima, sino una superfamilia de hemoproteínas de función catalítica, en la que el grupo tiol (-SH) de una cisteína, es el quinto ligando del átomo de hierro del grupo hemo, y una molécula de agua es su sexto ligando; la región de la cisteína y sus residuos vecinos son altamente conservados entre los citocromos, por lo que existe poca variedad entre ellos en su sitio de unión con el hierro; en organismos eucariotas, el peso molecular de los CYP450, oscila entre 50 y 60 KD y la similitud a nivel de estructura primaria (secuencia de aminoácidos), es relativamente baja, entre los distintos CYP450 siendo el extremo C-terminal más conservado que el N-terminal (23).

Esta familia de hemoprotínas se encuentra presente en varias especies, incluyendo bacterias, hongos y plantas, la primera estructura obtenida por cristalografía de rayos X fue bacteriana, conocida como P450cam (CYP101, *Pseudomonas putida*), durante varios años esta fue la única estructura P450 disponible, y permitió explicar de forma general la conformación topográfica y mecanismo de acción (24).

Se sabe que la molécula está constituida por una combinación de regiones en  $\alpha$ -hélice y en hojas plegadas (láminas  $\beta$ ) principalmente en la región de la proteína que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables son las que componen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos, la enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa hacia la parte citosólica de la membrana, esta hélice transmembrana está seguida, por regla general, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana. El término P450 se aplicó, para referirse a un pigmento con un máximo de absorción a 450 nm, al producirse el complejo de monóxido de carbono ferroso, en microsomas de hígado de rata; este máximo de absorbancia del grupo hemo, denominado como el pico de Soret, señala la unión del monóxido de carbono con el hierro, impidiendo la unión y activación del oxígeno molecular, y así inhabilitando reversiblemente la actividad enzimática; pudiendo aprovechar esta característica en su cuantificación espectrofotométrica (23,25,26).

La baja especificidad de CYP450 les permite metabolizar una gran cantidad de sustratos mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, de estas, las reacciones de

oxidación son de tipo monooxigenasa dependientes de NADPH, utilizan el oxígeno molecular y en respuesta de acción resulta la eliminación del organismo de un gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también es el responsable de la activación de toxinas o precarcinógenos (22).

En organismos procariotas, las enzimas CYP450 se encuentran presentes en el citosol, mientras que en los eucariotas se encuentran en las mitocondrias, y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso (microsomias). El hígado es el principal órgano donde se han reportado altos niveles de CYP450, y su expresión está regulada por factores genéticos (polimorfismos genéticos), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición), por lo cual, sus niveles hepáticos varían entre diferentes individuos, denotando evidentes diferencias que se justifican en el metabolismo de fármacos y xenobióticos, así como la variabilidad en la respuesta farmacológica o la variada susceptibilidad a la acción de tóxicos o carcinógenos (28).

Como se ha mencionado los CYP450 requieren electrones para reducir el oxígeno molecular, pueden clasificarse en cuatro clases en función de cómo acceden los electrones desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima. Las proteínas de clase I utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferridoxina); están asociados a la membrana interna de la mitocondria, y según su estudio filogenético no ha sido identificadas en plantas; en mamíferos se ha descrito en procesos de biosíntesis hormonal esteroidea y de la vitamina D<sub>3</sub>; por su parte, las de clase II necesitan de una reductasa del citocromo P450, que no se encuentra asociada, sino que está también anclada a la membrana microsomal, como se observa en la Figura 1, se encuentra de forma independiente y que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones y así finalmente liberar el sustrato hidroxilado y una molécula de agua, estas son más abundantes en organismos eucariotas, en los hongos se encargan de la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas, y en los vegetales intervienen en la síntesis y catabolismo de hormonas, la oxidación de ácidos grasos, las rutas metabólicas que conducen a la lignificación, la síntesis de pigmentos y compuestos de defensa (antioxidantes, fitoestrógenos, aromas) y finalmente en los animales, entre sus funciones fisiológicas se incluyen la biosíntesis y el catabolismo de moléculas señalizadoras, hormonas esteroideas y ácido retinoico; por último las de clase III, son autosuficientes y no requieren un donador

de electrones, participan en la síntesis de prostaglandinas en mamíferos; mientras que las de clase IV reciben los electrones directamente del NADPH y sólo se ha identificado en hongos (29).

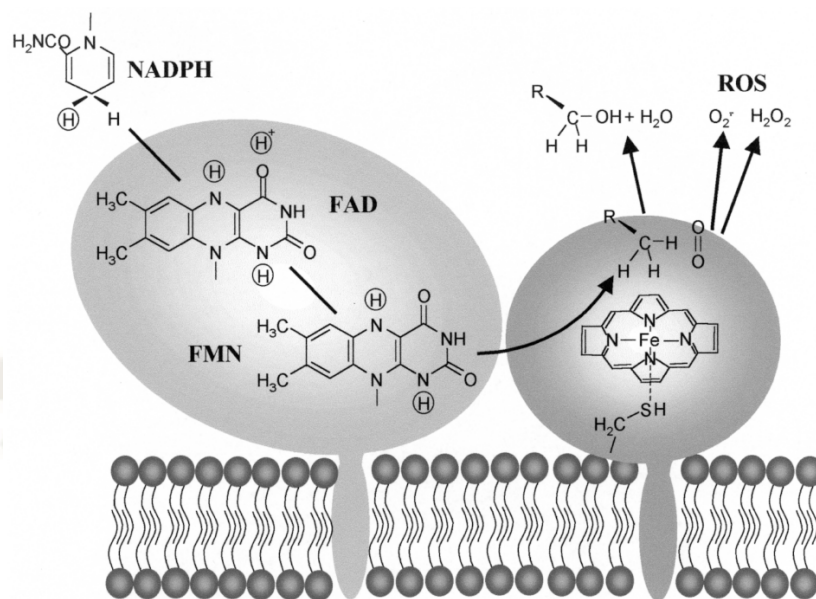


Figura 1. Localización del CYP450 en membranas microsomales (27)

Como se puede apreciar en la Figura 2, la reacción principal que catalizan los CYP450 es la monooxidación, que se inicia con la incorporación del xenobiótico (sustrato) al centro catalítico de la enzima, que en ese momento, tiene al átomo de hierro del grupo prostético hemo en estado oxidado (Fe<sup>+3</sup>), la reacción es dependiente de NADPH, que suministra el electrón necesario para la reducción del hierro a Fe<sup>+2</sup>; en el retículo endoplasmático el CYP450 está asociado a la citocromo P450 reductasa, esta enzima por sus grupos de flavina, uno de FAD y otro de FMN, puede transferir los electrones desde la coenzima NADPH de uno en uno, al grupo hemo del citocromo, a continuación, el oxígeno molecular ingresa en el centro catalítico de la enzima y se une al grupo hemo, el electrón del Fe<sup>+2</sup> es cedido a la molécula de oxígeno, y un segundo electrón, donado por el citocromo b5, en el caso de un sistema microsomal, reduce a la molécula de oxígeno unida y conjuntamente a un H<sup>+</sup>, dando lugar a la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de agua, y el otro aún unido al centro catalítico, oxida al xenobiótico; así mismo en un sistema mitocondrial los electrones son cedidos por un complejo NADPH-adrenoxina reductasa y la adrenodoxina, (25) llegando en ambos casos al final de la reacción del compuesto

oxidado que se libera de la enzima (metabolito), y esta puede iniciar un nuevo ciclo de catálisis (27,30).

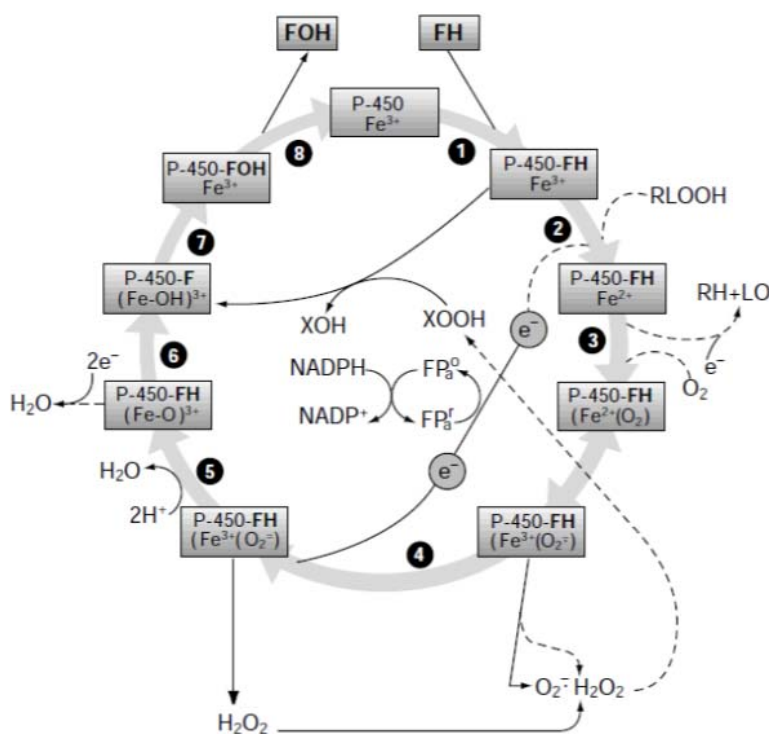


Figura 2. Ciclo catalítico del Citocromo P450 <sup>(31)</sup>

Respecto a la nomenclatura; las enzimas que comprenden esta superfamilia, se identifican con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y finalmente un número que corresponde al gen, así están identificados todos los CYP450, procariotas y eucariotas. En una misma familia se agrupan aquellas enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una homología mayor del 40%, independientemente de la especie de procedencia, dentro de una familia los CYP450 se agrupan en subfamilias que inician por la letra A, para pertenecer a una misma subfamilia deben tener una similitud de secuencia de aminoácidos superior al 55%; y por último, dentro de la misma subfamilia, las enzimas individuales se designan según números empezando siempre por el 1 y sus secuencias, deben diferir en más de un 3% (30).

La subfamilia CYP2C está representada por un 20% del contenido total de CYP450 hepático, presentando cuatro isoformas funcionales (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19), de ellas, la isoforma CYP2C9 es la mayormente reportada en lo que respecta a un hígado adulto, e intervienen en el metabolismo de aproximadamente el 20% de los fármacos

usados clínicamente, como lo son la fenitoína, tolbutamida, diazepam, hexobarbital, omeprazol, ácido tienílico y diclofenaco (32).

El CYP2C9 se encuentra en el cromosoma 10, brazo largo (q), región 23, banda 33; y se expande a lo largo de 50732 pares de bases (50kb), tiene 9 exones y unos intrones de gran tamaño, lo que justifica su gran longitud, codificando una proteína de 490 residuos de aminoácidos, entre sus muchos sustratos destacan el antiepiléptico fenitoína, el anticoagulante warfarina y la sulfonilurea, conocido hipoglucemiante, tolbutamida; así como también antiinflamatorios no esteroideos y la torsemida, se ha reportado que algunos fármacos también pueden comportarse como inhibidores del enzima, entre ellos se encuentra el fluconazol, ketoconazol, metronidazol, itraconazol y el ritonavir, entre otros; por su parte el CYP2C19, comparte un 92% de homología de secuencia con el CYP2C9, difiriendo solamente en 43 de los 490 residuos, se encuentran además localizados muy próximos en el mismo cromosoma, no obstante ambas enzimas tienen una especificidad de sustrato completamente distinta, actuando así por ejemplo, sobre la clomipramina, el diazepam, la imipramina, el omeprazol y el propranolol; y entre los inhibidores de este citocromo se encuentran la fluoxetina, la sertralina, el mismo omeprazol y también como en el caso del CYP2C9, el ritonavir (32–34).

### 1.7 IMPLICANCIAS GENÉTICAS

Como se ha visto, la importancia del rol que cumple el CYP450 en el metabolismo de xenobióticos, permite señalar a los diversos factores que regulan y determinan la actividad enzimática, como la edad, género, estado nutricional, comorbilidades hepáticas o renales y finalmente también las variaciones genéticas, que codifican para el desempeño de cada enzima metabolizadora sobre los respectivos fármacos. En el caso de la epilepsia, los CYP que metabolizan los principales FAEs, han reportado variaciones genéticas de naturaleza polimórfica, lo que se refleja en variaciones interindividuales en la respuesta al tratamiento; esta respuesta particular de cada individuo a presentar tasas de metabolismo variadas para su medicación según las características genéticas de sus citocromos, es estudiada por la farmacogenética (35).

A diferencia de las mutaciones, se señala a la variación en la secuencia de ADN que acontece en una población con frecuencia del 1% o mayor, con el término de polimorfismo, que quiere decir “de muchas formas”, esto se explica con la variación de alelos que puede presentar un mismo gen; como se sabe la carga genética de cada individuo

es heredada por ambos progenitores, lo que proporcionará dos alelos por cada gen y sus posibles variaciones en secuencias codificantes pueden ocasionar cambios que se proyecten en formas alternas para una misma proteína; según su localización, los polimorfismos que se encuentren en la zona promotora del gen, pueden influir en la expresión génica del ARNm, (ácido ribonucleico mensajero), o en regiones no traducidas como lo son los intrones, y es por ello que de acuerdo al efecto producido se pueden clasificar como sinónimos o silenciosos, a aquellos que no alteran la conformación del gen, cuando la secuencia nucleotídica cambia, ya que el codón que codifica el aminoácido original se cambia por otro que posee características similares, no produciendo cambios en la función protéica; por otro lado están los no sinónimos, que si provocan una variación en la función, al localizarse en la región promotora, influenciando directamente con la transcripción del gen, o en sitios de *splicing* alterando la eliminación de intrones y empalme de exones; por su abundancia y distribución, su estudio ha sido desarrollado para tratar de explicar el origen, demografía y adaptación de las poblaciones, así como también para reconstruir parte de la historia evolutiva (36).

### 1.8 POLIMORFISMOS GENETICOS EN LOS GENES CYP2C9 Y CYP2C19

Los polimorfismos de nucleótido único, denominado SNP por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*, se caracterizan, como su nombre lo indica, por la variación de un solo nucleótido en la secuencia de una región dada, esta variación puede ser por la delección, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica, su frecuencia se reporta cada 1000 a 3000 pares de bases a lo largo del genoma (36,37).

La relación entre la presencia de un SNP y la respuesta al tratamiento con FAEs se refleja en la variada actividad que puede presentar la enzima frente al proceso de biotransformación generando así una clasificación fenotípica de los individuos bajo los siguientes grupos:

- Metabolizadores lentos (ML), aquellos que carecen de actividad enzimática normal, son portadores homocigotos o heterocigoto para el alelo menos frecuente.
- Metabolizadores intermedios (MI): tienen actividad enzimática más baja que la promedio, con genotipo heterocigoto para la variante alélica menos frecuente.
- Metabolizadores eficientes o extensivos (ME): portadores de dos variantes funcionales.

- Metabolizadores ultrarrápidos (MU): tienen actividad enzimática elevada respecto al promedio, pueden poseer dos variantes funcionales para el alelo menos frecuente y este provocar un metabolismo acelerado (38).

Se ha descrito como el alelo más común al CYP2C9\*1, el cual es considerado tipo silvestre, a su vez algunas variantes alélicas del CYP2C9 codifican proteínas con una actividad disminuida como es el caso del CYP2C9\*2 que contiene una sustitución puntual transitiva de la base nitrogenada citosina por timina, C>T, en la posición 430 del exón 3, produciendo un cambio de aminoácido de arginina por cisteína en la posición 144, provocando una disminución en la actividad enzimática a un 3-4% lo que la sitúa en una clasificación fenotípica ML (38,39).

Las variantes alélicas identificadas para el CYP2C19 se han vinculado a la producción de proteínas deficientes o con ausencia de actividad enzimática, las más usuales en los fenotipos establecidos como ML son CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3. El polimorfismo CYP2C19\*2 se caracteriza por llevarse un cambio transitivo de bases de guanina por una de adenosina G>A en la posición 681 en el exón 5, originando un sitio de empalme aberrante; el cambio altera el marco de lectura del ARNm a partir del aminoácido 215 y produce un codón de terminación prematuro con 20 aminoácidos menos, dando lugar a una proteína truncada no funcional, por su parte el polimorfismo CYP2C19\*3 se da también por un cambio transitivo de bases de guanina por adenosina G> A, solo que este, se produce en la posición 636 del exón 4, que resulta de cambiar el codón triptófano al codón terminal en el aminoácido 212 y el truncamiento de la proteína (40).

### 1.9 IDENTIFICACIÓN POR PCR-RFLP

El análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de fragmentos amplificados por PCR conocido como PCR-RFLP, es una técnica popular para los análisis de genética en la detección de la variación intra e inter especies, los SNP's han sido ampliamente estudiados bajo dicha técnica, ya que basándose en la variación de un sitio de reconocimiento específico, es posible distinguir la presencia o no, del cambio de nucleótido característico en una región del gen conocida, a través de la digestión con una determinada enzima de restricción (41).

El primer paso en un análisis de PCR-RFLP es la amplificación de un fragmento que contiene la variación buscada, mediante la técnica de PCR convencional; en este caso la

variación será el cambio de nucleótido cuando se presente una variación alélica del gen en estudio, seguidamente se procede con el tratamiento del fragmento amplificado con una enzima de restricción apropiada, para ello se emplean enzimas de restricción que cortan secuencias específicas del ADN, y las variaciones dentro de la secuencia diana proporcionarían fragmentos de restricción de distintos tamaños originando un patrón distinto al de un alelo silvestre, en la identificación por resolución electroforética, distinguiendo así los genotipos homocigotos o heterocigotos según sea el caso (6).

Como se sabe un gen se presenta en doble dosis, los alelos que lo constituyen son aportados por ambos progenitores, y las formas alélicas de un mismo gen existen por los diversos cambios a los que está sometida la secuencia del ADN, siendo estas mutaciones al azar de carácter estable o heredable; en algunas ocasiones propiciando una función distinta al alelo silvestre, estos cambios en la secuencia del ADN son la base de la variación gradual de la estructura genética de las poblaciones y por ende de la evolución (41,42).

Un ejemplo de resolución mediante la técnica de PCR-RFLP se puede describir como un caso en el que el sitio de restricción se reconoce en ambas cadenas de ADN, se considera al individuo homocigoto y al revelar los fragmentos mediante una corrida electroforética se obtiene como resultado una sola banda en el gel de agarosa a una distancia determinada; por otro lado si es heterocigoto significa que tiene los alelos distintos en un determinado locus por lo que se podrá distinguir más de una banda para el fragmento sin corte de restricción y otras con el corte, por lo que los genotipos distinguidos pueden ser entonces C/C (ambos alelos fueron cortados), C/NC (solo un alelo manifiesta el corte), o NC/NC (ninguno de los dos alelos fue cortado), sin embargo todo dependerá de la enzima de restricción a utilizar, si esta reconoce un sitio de restricción en una secuencia con o sin la presencia de la variación nucleotídica (43,44).

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La captación de pacientes epilépticos y recolección de muestras fue llevada a cabo en el Servicio de neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza de Arequipa, entre los meses de febrero - junio del año en curso.

El procesamiento de muestras fue realizado en el laboratorio Biología Molecular y Farmacología experimental H-401.

#### 2.2 MATERIALES

##### 2.2.1 Muestras Biológicas

- Sangre periférica de pacientes epilépticos atendidos en el servicio de neurología del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza de Arequipa.
- Sangre periférica de alumnos y familiares voluntarios no relacionados a la enfermedad.

##### 2.2.2 Material de Laboratorio

- Cubeta de cuarzo de 100  $\mu$ L
- Probeta de 50 mL
- Matraz de 50 mL
- Tubos de 1.5 mL
- Tubos para PCR de 200  $\mu$ L

##### 2.2.3 Reactivos

- Agarosa grado biología molecular-GBM (Cleaver Scientific Ltd)
- Buffer TAE 1X (Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- Buffer TAE 0.5X (Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- Agua grado biología molecular GBM (Pan Reac AppliChem)

##### 2.2.4 Equipos e Instrumentación

- Micropipetas de 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 10  $\mu$ L
- Espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies)
- Cámara de electroforesis horizontal tipo submarino, modelo Mini-Sub Cell GT (BIO-RAD)
- Termociclador modelo Peqstar (PeqLab)

- Termo Bloque para tubos eppendorf modelo TS-100 (Biosan)
- Transiluminador UV modelo Clear View (Cleaver scientific Ltd)
- Fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen)
- Cabina de seguridad para pre-PCR Clean View UV Cabinet CSL-UVCAB (Cleaver scientific Ltd)

### 2.2.5 Otros Materiales

- Kit de extracción de ADN (innuPREP Blood DNA Mini Kit, analytikjena)
- Kit de PCR (innuMIX Standard PCR MasterMix, analytikjena)
- Cebadores (Primers) específicos para cada variante alélica (LGC Biosearch Technologies)
- Enzimas de restricción, *Sau96I*, *SmaI* y *BamHI*, (Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- Marcador de peso molecular 100pb (Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- Loading buffer(Thermo Fisher SCIENTIFIC)
- Intercalante de ácidos nucleicos SYBR<sup>®</sup> safe, (Invitrogen)
- Kit de cuantificación de DNA (Qubit dsDNA BR Assay Life Technologies.)

## 2.3 METODOLOGÍA

### 2.3.1 Selección y toma de muestra de pacientes epilépticos y voluntarios control

Para la selección de pacientes epilépticos se tuvo en cuenta criterios de inclusión y exclusión, nombrados a continuación:

#### Criterios de inclusión – Pacientes epilépticos

- Pacientes epilépticos mestizos que acudan a consulta externa del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza.
- Pacientes con diagnósticos clínico de epilepsia.
- Pacientes de ambos sexos, adultos, con edad entre 18 y 80 años.
- Pacientes con una o más crisis por mes a pesar de haber recibido adecuadamente y con dosis plena diaria 1 o 2 fármacos Antiepilépticos de primera línea.
- Falta de eficacia de fármacos antiepilépticos en monoterapia y/o una combinación de ellos (poli terapia), pese a cumplir las indicaciones de manejo.
- Pacientes que se encuentran actualmente en monoterapia o poli terapia con máximo de 2 antiepilépticos.

- Pacientes con función hepática normal, valores de transaminasas pirúvica y oxaloacética, fosfatasa alcalina y bilirrubina dentro de los límites de la normalidad.

#### **Criterios de Exclusión – Pacientes epilépticos**

- Pacientes que no deseen participar en el estudio.
- Pacientes inadecuadamente diagnosticados (eventos paroxísticos no epilépticos) o tratados (pseudoresistentes), es decir con selección inapropiada del fármaco antiepiléptico.
- Pacientes con uso concomitante de otros antagonistas de canales de calcio, esteroides, macrólidos, recibidos con un mes de anterioridad al ingreso del estudio.
- Pacientes con sospecha o diagnóstico de enfermedad degenerativa o progresiva del sistema nervioso.
- Pacientes con concomitancia de enfermedades crónicas como autoinmunidad, diabetes o cáncer.
- Mujeres embarazadas

Del mismo modo, los voluntarios control, fueron seleccionados bajo los siguientes criterios de inclusión y exclusión

#### **Criterios de inclusión – Voluntarios Control**

- Personas sanas, sin antecedentes familiares de epilepsia.
- Personas entre 18 y 80 años.
- Personas de nacionalidad peruana

#### **Criterios de exclusión – Voluntarios Control**

- Mujeres embarazadas
- Pacientes que se retiren en cualquier momento del estudio

En lo que respecta a la toma de muestra, se recolectaron 3 mL de sangre periférica, de cada paciente epiléptico y voluntario control, en un tubo con anticoagulante EDTA, (ácido etilendiaminotetracético), el cual actúa como quelante sobre el ion calcio, permitiendo así el manejo de la muestra, dicho procedimiento sigue las instrucciones del Manual de Procedimientos del Laboratorio de Biología molecular y Farmacología experimental H-401, tal como se muestra en la Figura 3 y se describe en el ANEXO 1; las muestras fueron rotuladas con un respectivo código asignado, se almacenaron de 4 a 8 °C hasta ser trasladadas al laboratorio de Biología molecular y Farmacología experimental



Figura 3. Extracción de sangre periférica por venopunción y colección en tubos con anticoagulante EDTA.

### 2.3.2 Extracción y evaluación del ADN genómico de células sanguíneas

#### 2.3.2.1 Extracción de ADN por el método de Fase sólida con Columnas de Sílica.

El ADN genómico fue extraído de las 160 muestras de sangre periférica (pacientes epilépticos y voluntarios control), en duplicado, utilizando el Kit *innuPREP Blood DNA Mini Kit, analytikjena*, señalado en la Figura 4, bajo las cantidades e indicaciones descritas según el fabricante, detalladas en el ANEXO 2.

El fundamento del método radica en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. En condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa de moléculas de agua que conserva la solubilidad del ADN en soluciones acuosas; con la adición de iones caotrópicos, se pierde esta estructura ordenada de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN.(45)

Bajo este ambiente, los grupos fosfato de los ácidos nucleicos quedaron expuestos y se unen perfectamente a la membrana de sílica de las columnas de extracción, ya que por la diferencia de cargas entre estos y la membrana se ve facilitada la adsorción, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados durante los pasos de lavado, finalmente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante inicial, liberándolos así de la membrana(46).



Figura 4. Materiales para la extracción de DNA por columnas de sílica

Las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis molecular.

### 2.3.2.2 Medición de la Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) del ADN Genómico Extraído por Fluorometría.

La concentración del ADN genómico extraído, fue medida utilizando el kit Qubit® dsDNA HS Assay Kits, siguiendo las indicaciones del fabricante (ANEXO 3), basado en el método de cuantificación por fluorometría, el cual es mucho más sensible que el espectrofotométrico, su fundamento radica en la unión específica de colorantes fluorescentes al ácido nucleico, en este caso el ADN, que absorbe luz de una determinada longitud de onda y emite luz de una longitud de onda superior, la relación entre la concentración del ácido nucleico y la intensidad de emisión fluorescente es directamente proporcional; esta técnica requiere de estándares de concentración conocida con los cuales se pueda interpolar los valores de la muestra. (47). En este caso los estándares facilitados por el Kit comprenden un rango de 0 a  $600\text{ ng}/\mu\text{L}$ .

El fluorómetro empleado fue el Qubit® 2.0, como se aprecia en la Figura 5, que provee valores de lectura en  $\text{ng/mL}$ , estos corresponden a la concentración después de que la muestra se diluyera para su lectura, por lo que el kit señala el uso de la Ecuación 1 para poder conocer la concentración de ADN que se ha logrado extraer en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

$$\text{Concentración de la muestra} = QF \times \frac{200}{x} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde QF: Valor proporcionado por el Fluorómetro Qubit® 2.0

x: Volumen de muestra añadido al tubo de lectura

Esta técnica no proporciona información acerca de pureza del producto de extracción, por lo que se debe hacer una evaluación de la calidad del ADN extraído, por la relación A260:A280; además de valorar la integridad, por medio de un análisis electroforético.



Figura 5. Materiales para la medición de la concentración de ADN

### 2.3.2.3 Evaluación de la calidad del ADN genómico extraído por Espectrofotometría.

La calidad del ADN genómico extraído, es reportada a través de la técnica de espectrofotometría, como se sabe cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene, los nucleótidos de ADN presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm en el rango de luz UV. Incluso si la técnica de extracción está correctamente realizada, solventes, componentes orgánicos, o proteínas celulares pueden acompañar el ADN, y ya que estas moléculas poseen valores de absorbancia particulares en una determinada longitud de onda; con el fin de evaluar su pureza la muestra se lee a 260 nm y se compara con la absorbancia de interés; dado que las proteínas en especial los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280 nm, se utiliza la relación de absorción 260/280nm, cuando este se encuentra entre 1.7 y 2.0 se considera óptimo, ya que los valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi únicamente ADN, un valor muy por debajo propone contaminación por proteínas, y un índice mayor a 2.0 indica una ruptura en las cadenas de ácidos nucleicos, por lo que se le considera de baja calidad.(47)

Para realizar la lectura se procedió con una dilución 1:10 (10  $\mu$ L en 90  $\mu$ L) de la muestra de ADN genómico extraído, utilizando agua GBM, en un volumen final de 100  $\mu$ L.

Posteriormente se calibró a cero el espectrofotómetro con agua GBM, y se añadió a la cubeta de cuarzo de 100  $\mu$ L la dilución de la muestra, registrando los valores a las longitudes de onda de 260 y 280 nm.

#### 2.3.2.4 Evaluación de la integridad del DNA genómico extraído por electroforesis

Se preparó un gel de agarosa 1%, pesando 0.15 g de agarosa GBM y disolviendo, en 15 mL de buffer TAE 1X, aplicando calor con el uso del microondas. Para la visualización del ADN genómico, el gel fue teñido con 2  $\mu$ L de un intercalante de ácidos nucleicos (*SYBR<sup>®</sup> safe DNA gel stain*), como se detalla en el ANEXO 4, procedimiento que sigue las instrucciones del Manual de Procedimientos del laboratorio Biología Molecular y Farmacología experimental H-401. Finalmente se programó una intensidad de corriente de 90 V por 30 minutos en la fuente de poder, como se observa en la Figura 6.



Figura 6. Materiales utilizados para la evaluación de integridad del ADN genómico extraído.

El principio de la electroforesis consiste básicamente en la migración proporcional de las moléculas a través de una matriz porosa, en este caso un gel de agarosa, según su peso molecular o tamaño, el movimiento es generado por el campo eléctrico dentro de la solución que se encuentra sumergido el gel que contiene las muestras, ya que los ácidos nucleicos poseen carga negativa conferida por los grupos fosfato en su estructura, estos

migraran gracias al alto contenido de electrolitos en el medio, que permite la transmisión de corriente eléctrica, hacia el polo positivo que es el ánodo; logrando así su desplazamiento. (48)

### 2.3.3 Detección de los Polimorfismos en los genes CYP2C9 \*2 y CYP2C19 \*2 y \*3 por PCR-RFLP

Luego de evaluar la concentración, calidad e integridad de las muestras de ADN genómico extraído, tanto en pacientes epilépticos, como voluntarios control; se analizó el gen CYP2C9 para su variante alélica CYP2C9\*2 y el gen CYP2C19 con sus variantes alélicas CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, empleando la técnica de PCR-RFLP, para lo cual se realizó primero la amplificación de la región de interés mediante la técnica de PCR, seguida de la digestión enzimática.

#### 2.3.3.1 Amplificación de la región de interés mediante PCR.

Se utilizó el kit *innuMIX Standard PCR MasterMix*, cuya presentación consta de una mezcla de reacción lista para su uso; los cebadores (primers) específicos utilizados, descritos en la Tabla 1, fueron consignados dentro de la región señalada siguiendo el respectivo número de identificación de cada gen, en la base de datos NCBI (49–51), constatando así el tamaño del amplicón generado.

Tabla 1. Primers específicos para la amplificación de los genes CYP2C9 y CYP2C19

Primer	Secuencia	Amplicón generado	Referencia
CYP2C9*2F	CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG	375 pb	(3,52)
CYP2C9*2R	GTGATATGGAGTAGGTCACCCAC		
CYP2C19*2F	AATTACAACCAGAGCTTGGC	168 pb	(3)
CYP2C19*2R	TATCACTTTCCATAAAAGCAAG		
CYP2C19*3F	ATTGAATGAAAACATCAGGATTG	132 pb	
CYP2C19*3R	ACTTCAGGGCTTGGTCAATA		

Antes de iniciar el preparado de la mezcla de reacción de PCR, se desinfectó con etanol al 70% la cabina para pre-PCR, colocando los materiales necesarios en su interior y esterilizándolos encendiendo la luz UV por 15 minutos, pasado el tiempo de esterilización,

se ingresó a la cabina con las manos desinfectadas con etanol al 70%, como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Disposición de la cabina de Pre-PCR y preparación de reacción

Se seleccionaron los cebadores (primers) a utilizar; y se prepararon para su uso, reconstituyéndolos a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , esta fue la solución stock, que se utilizó en todas las reacciones siguientes, esta solución se llevó a cabo, añadiendo agua GBM, a cada primer, forward y reverse, para los tres genes a estudiar. En un tubo de 1.5 mL, se preparó una alícuota de cada primer a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR de 200  $\mu\text{L}$ , agregando el SuperMix, primers, agua y finalmente el ADN, este último es añadido fuera de la cabina de pre-PCR, las cantidades de cada uno están descritas en la Tabla 2; las reacciones de PCR deben llevar consigo un control negativo a modo de monitoreo del procedimiento, ya que este no cuenta con una muestra de ADN y en su lugar se adiciona agua, indicando así que si se visualiza alguna banda en su carril, al momento de la evaluación por electroforesis, la reacción no sería considerada correcta ya que existió contaminación en el procedimiento, ya sea por parte de los materiales, reactivos o manipulación del ejecutor.

Tabla 2. Preparación de la reacción de PCR para los genes CYP2C9 y CYP2C19

	<b>CYP2C9*2</b>	<b>CYP2C19*2</b>	<b>CYP2C19*3</b>
Concentración de primer en la reacción ( $\mu\text{M}$ )	0.25	0.6	0.5
Primer (uL)	1	2.4	2
SuperMix (uL)	10	10	10
DNA (uL)	5	5	5
H <sub>2</sub> O (uL)	4	2.6	3
Volumen final (uL)	20	20	20

Las Tablas 3, 4 y 5 a continuación señalan el protocolo de amplificación programado en el termociclador para la amplificación de los genes CYP2C9\*2, CYP2C9\*2 y CYP2C19\*3 respectivamente.

Tabla 3. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C9\*2

<b>Pasos PCR</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (seg)</b>
Activación Enzimática	95	180
Desnaturalización	95	30
Hibridación	60	10
Elongación	72	60
Extensión Final	72	420

N° de Ciclos: 35

Tabla 4. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C19\*2

<b>Pasos PCR</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (seg)</b>
Activación Enzimática	95	180
Desnaturalización	95	60
Hibridación	54.7	30
Elongación	72	30
Extensión Final	72	300

N° de Ciclos: 35

Tabla 5. Protocolo de Amplificación del Gen CYP2C19\*3

Pasos PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Activación Enzimática	95	180
Desnaturalización	95	30
Hibridación	56.1	20
Elongación	72	60
Extensión Final	72	300

N° de Ciclos: 35

La amplificación para cada gen fue llevada en duplicado en cada una de las muestras, para así obtener mayor precisión ante el ensayo.

### 2.3.3.2 Evaluación de los productos de PCR por electroforesis:

Para la detección del producto de amplificación de cada variante alélica, se repararon geles de agarosa al 2% de concentración, en 15 mL de buffer TAE 1X, teñidos con 2uL de SYBR® safe, como se detalla en el ANEXO 4, siguiendo las instrucciones del Manual de Procedimientos de Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología experimental, y se programó una intensidad de corriente de 80 V por 15 minutos, seguidos de 70 V a 15 minutos. El fragmento obtenido en cada caso, fue visualizado como una banda en el gel de agarosa que es considerada correspondiente a la cantidad de producto amplificado y su longitud se confirmó por la interpolación contra un marcador de peso molecular con longitudes conocidas, en este caso el utilizado es de 100 pb de Thermo Fisher SCIENTIFIC.

### 2.3.3.3 Digestión enzimática y evaluación electroforética de los productos de amplificación por PCR.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Sau96I*, *SmaI* y *BamHI*, como se presenta en la Figura 8, para la digestión de los productos de amplificación obtenidos por PCR, de los genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3 respectivamente.

Según las especificaciones del fabricante se adicionó en un tubo de reacción de PCR de 200 uL, 18 uL de agua GBM, 10 uL del producto de PCR correspondiente, 2 uL de buffer de reacción y finalmente 1 uL de la enzima de restricción respectiva; logrando la digestión

en un periodo de 4 horas de incubación a una temperatura señalada como la idónea para lograr los cortes necesarios sobre el amplicón.



Figura 8. Enzimas de restricción utilizadas *Sau96I*, *SmaI* y *BamHI*

Por lo que para el gen CYP2C9\*2, la enzima *Sau96I* trabajó sobre el producto de PCR incubando a 37 °C por 4 horas y finalizado este tiempo, se visualizó los productos digeridos en un gel de agarosa al 2 %, bajo las condiciones de corrida de 80 V por 10 minutos, 70 V por 15 minutos y 65 V adicionales por 15 minutos.

Para la digestión del gen CYP2C19\*2 con la enzima *SmaI*, se dispuso la incubación por 4 horas a 30°C, y la visualización de los productos de digestión obtenidos se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% con una intensidad de corriente de 80 V por 15 minutos y 70 V por 30 minutos.

Finalmente para la digestión del gen CYP2C19\*3 con la enzima *BamHI*, tras la incubación de 4 horas a 37 °C, se procedió con el análisis electroforético en un gel de agarosa al 2.5% bajo las condiciones de corrida de 80 V por 15 minutos y 70 V por 15 minutos.

Las muestras fueron procesadas en duplicado, tanto en el caso de los pacientes epilépticos, como los voluntarios control, así mismo, se utilizó la plataforma virtual *Restrictionmapper* para una digestión implícita de los fragmentos amplificados, proporcionando información del tamaño esperado de los fragmentos a visualizar, tras la digestión enzimática, al igual que en las corridas electroforéticas de productos de PCR, se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb, como referencia ante los fragmentos de digestión obtenidos.

La identificación de los polimorfismos de acuerdo al genotipo, se denominaron bajo la combinación alélica respectiva, siendo el \*1, la forma silvestre o conservada del gen, \*2 la forma polimórfica de subtipo 2 y \*3 la forma polimórfica subtipo 3; por lo que un

genotipo homocigoto silvestre posee la combinación alélica \*1/\*1, y los genotipos heterocigotos polimórficos de la forma \*1/\*2 o \*1/\*3, según sea el caso.

#### **2.3.4 Reporte y análisis descriptivo de las frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes epilépticos y voluntarios control**

Se realizó un análisis descriptivo de la distribución genotípica en los pacientes epilépticos y voluntarios control, donde se distinguió una relación intergrupar determinada por el sexo en ambos grupos, mediante la prueba del chi-cuadrado, se identificó las posibles relaciones entre los genotipos presentes en pacientes epilépticos y voluntarios control, a fin de asignar una interpretación estadística a la presencia o ausencia de cada polimorfismo, para el análisis, se halló el Odds Ratio (OR) y se consideró un intervalo de confianza del 95 %; bajo el mismo análisis se identificó las frecuencias alélicas y genotípicas consideradas como un estudio de casos y controles, donde los casos fueron los pacientes con resistencia al tratamiento y los controles, pacientes con respuesta a su medicación; finalmente se realizó el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg para conocer la relación entre las proporciones de los genotipos de cada gen en la población estudiada.

El análisis estadístico se realizó en el programa Microsoft Excel v2013.

#### **2.3.5 Relación del estado polimórfico de los genes del citocromo P450, CYP2C9\*2 y CYP2C19\*2 y \*3, con otras poblaciones**

Se asoció el estado polimórfico de la población estudiada con reportes de frecuencia alélica presente en poblaciones de origen turco, marroquí, chino, japonés, español, africano y una población latina como lo es la mexicana, para poder entender el flujo genético y relacionar bajo la influencia de cual población se pueden encontrar los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 SELECCIÓN Y TOMA DE MUESTRA DE PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL

Los pacientes epilépticos atendidos por consulta externa en el servicio de Neurología perteneciente al Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza Arequipa, fueron previamente informados por su médico tratante, el cual llenó una Ficha de recolección de datos y seguimiento, (ANEXO 5) donde se especificaron datos clínicos como el tipo de epilepsia, año de diagnóstico, y la medicación que ha venido recibiendo, además de acotaciones pertinentes como consideraciones relacionadas al último encefalograma realizado y otros diagnósticos y/o tratamientos.

Así como a los voluntarios control, el muestreo fue realizado a personas mayores de 18 años, previamente informadas del estudio a través de su firma en un consentimiento libre informado (ANEXO 6), y en casos especiales de menores de edad con consentimiento de sus padres o tutores, el documento fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas de Lima, proporcionando así la autorización a la toma de muestra de sangre periférica por venopunción.

De un total de 80 pacientes epilépticos, se distinguió un 45% para epilepsia tónico-clónica generalizada, dentro de estas el 11.11 % son secundarias a un traumatismo o accidente cerebro vascular, y el 5.55 % son de carácter refractario; del total de pacientes epilépticos, el 12.5 % han desarrollado la enfermedad por causas secundarias, y el 15 % son descritas como crisis generalizadas, 3.75 % están identificados como epilepsia refractaria propiamente dicha, además de ello el 3.75 % de pacientes han sido distinguidos por presentar crisis de ausencia; el 1.25 % se señala bajo crisis recurrentes, es decir sin clasificación o especificación de un tipo de epilepsia en específico, el 18.75 % solo señalan padecer de la enfermedad desde un año de diagnóstico en específico, sin ninguna especificación o clasificación en cuanto al tipo de epilepsia o tipo de crisis; además de todo ello el 7.5 % de los pacientes epilépticos, no señalan año de diagnóstico.

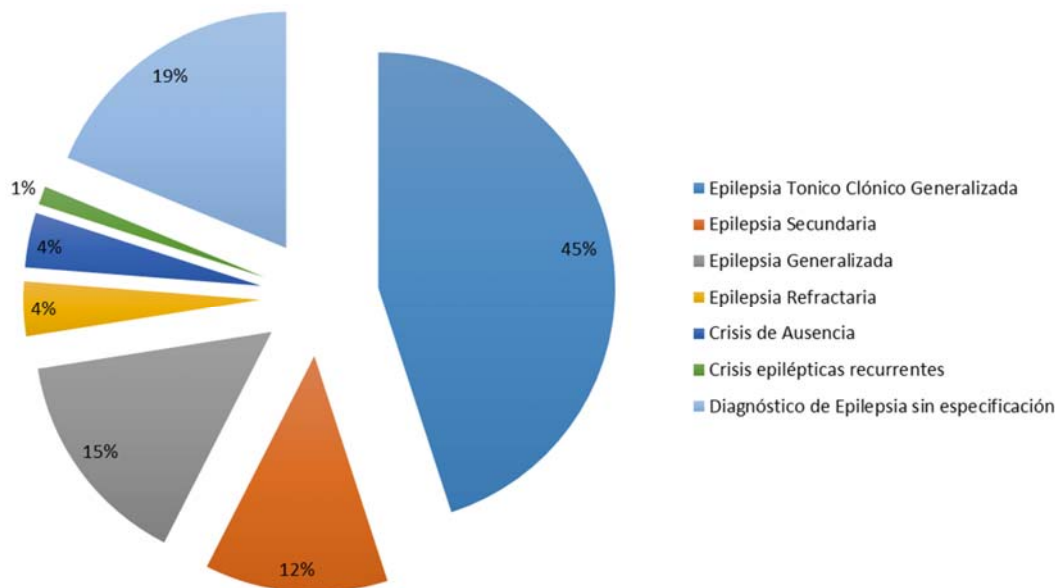


Figura 9. Descripción porcentual del estado de Diagnóstico de Epilepsia en la población de estudio

Inicialmente se planeó dirigir el estudio clasificando a los pacientes epilépticos bajo el criterio de farmacorresistentes y farmacorrespondedores, y así poder comprobar la influencia del estado polimórfico sobre la respuesta al fármaco, sin embargo como se señala en la Figura 9, solo un 3.75% de los pacientes tiene un diagnóstico esclarecido y definido como epilepsia refractaria, es decir que no respondieron a su medicación, por lo que tuvieron cambios en la dosis y prescripción.

Tras el análisis de las fichas de recolección de datos, se pudo distinguir que en su mayoría, los pacientes cambiaron de medicación a lo largo del tiempo que vienen siendo atendidos, esto a diversos factores, como su edad, etapa de vida, o condición económica.

Al no contarse con un número representativo definido por un diagnóstico propiamente dicho; el grupo correspondiente a farmacorresistentes se definió con pacientes que especificaron no haber respondido de manera adecuada a al menos un fármaco a lo largo del desarrollo de su enfermedad; y el grupo de farmacorrespondedores corresponde a aquellos pacientes que desde su diagnóstico no contemplaron problemas con alguna medicación recibida.

### 3.2 EVALUACIÓN DE ADN GENÓMICO EXTRAÍDO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

El estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se emprende mediante marcadores moleculares, este es el caso de los polimorfismos de nucleótido único que proveen información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos.

Para el inicio de la aplicación de técnicas moleculares se procedió a la extracción de ADN genómico de las muestras de sangre periférica tanto en pacientes epilépticos como en voluntarios control, se sabe que la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro (53), bajo estas consideraciones, se ha logrado extraer de manera satisfactoria el ADN genómico a partir de sangre periférica de los pacientes epilépticos y voluntarios control, este procedimiento se llevó a cabo en duplicado, lo que hace un total de 320 muestras de ADN.

La cuantificación fluorométrica de ADN genómico extraído, se obtuvo en promedio 37.86 ng/ $\mu$ L de concentración, para las muestras de pacientes epilépticos, las lecturas registradas para cada muestra se detallan en el ANEXO 7, de igual manera para las muestras de voluntarios control, se obtuvo un promedio de 45.03 ng/ $\mu$ L, señalado en el ANEXO 8.

La calidad del ADN genómico fue determinada satisfactoriamente por espectrofotometría, este procedimiento se llevó a cabo para cada muestra obteniéndose, el promedio de la relación A260/A280 para los pacientes epilépticos de 1.85, detallado en el ANEXO 9 y para voluntarios control fue de 1.86, señalado en el ANEXO 10, lo que indica que se obtuvo ADN sin contaminación o interferentes por proteínas y en perfectas condiciones para proceder con el análisis molecular.

Las Figuras 10 y 11, señalan de forma referencial las muestras de ADN genómico extraídas para pacientes epilépticos y voluntarios control, respectivamente, por medio del análisis electroforético, evidenciando su integridad con una banda definida en el gel de agarosa.

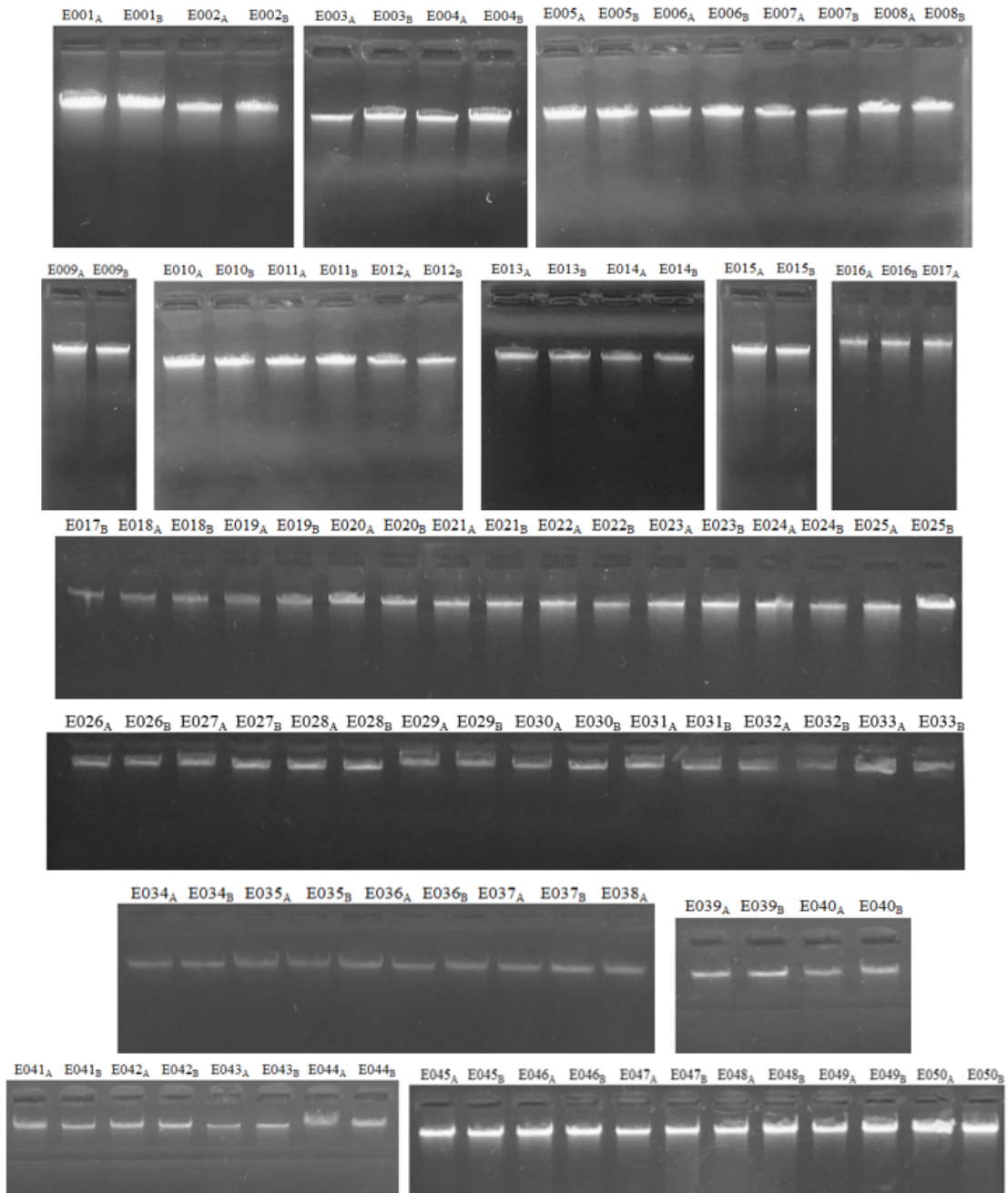


Figura 10. ADN genómico extraído de Pacientes Epilépticos

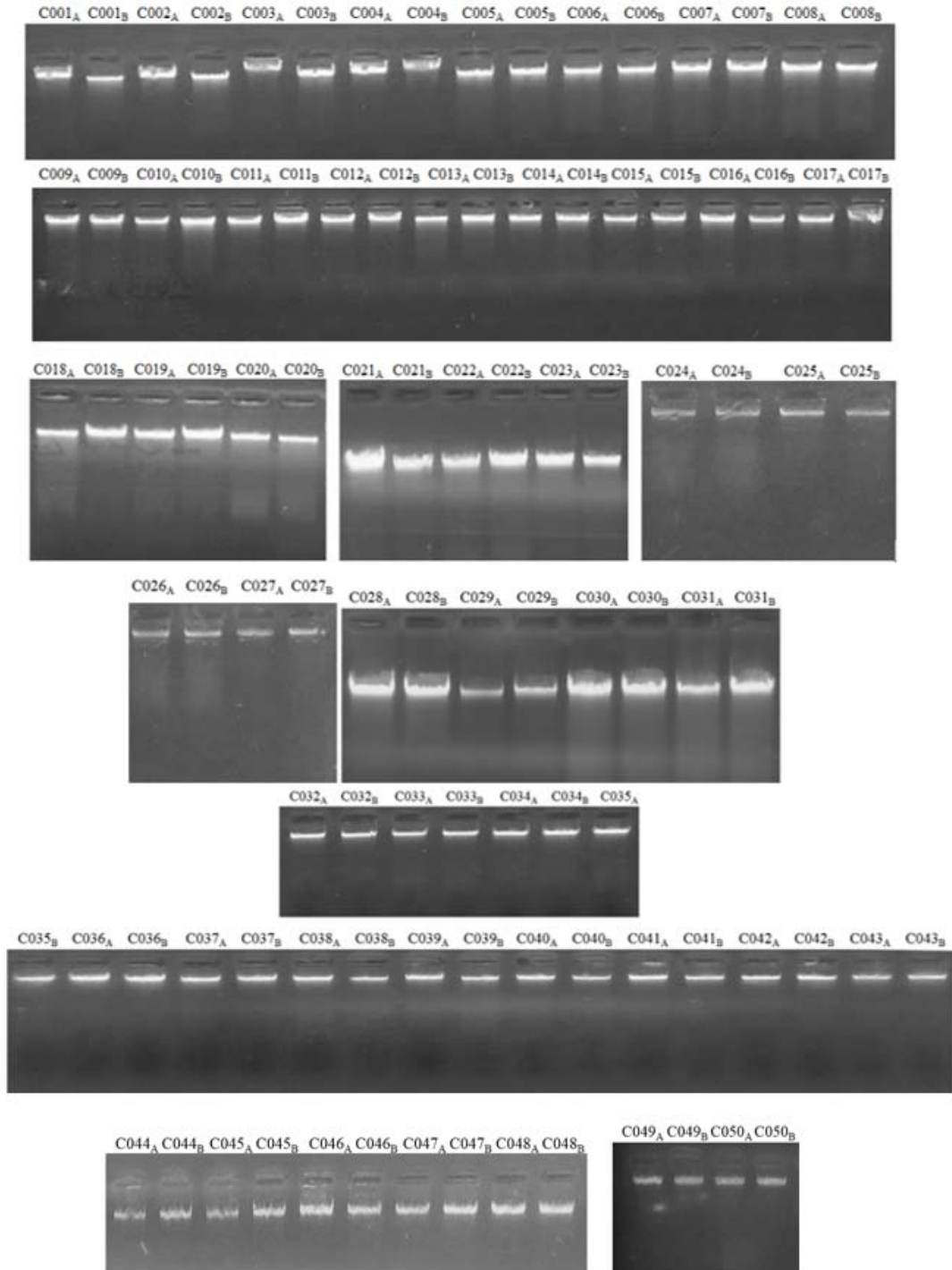


Figura 11. ADN genómico extraído de Voluntarios Control

### 3.3 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 Y CYP2C19\*3 POR PCR-RFLP

Se logró amplificar la región que comprende el gen CYP2C9 variante alélica 2, mediante la técnica de PCR, la secuencia amplificada desde el extremo 5' al 3' se puede observar en la Figura 12, así mismo la posición señalada para el posible caso de ser una muestra polimórfica, está representada por una letra color verde, distinta a las conferidas para los nucleótidos conocidos.

```
5' CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAGGATTTGGTAGGTGTGCATGTGCCTGTTTCAGCA
TCTGTCTTGGGGATGGGGAGGATGGAAAACAGAGACTTACAGAGCTCCTCGGGCAGAGC
TTGGCCCATCCACATGGCTGCCAGTGTCTCAGCTTCCTCTTCTTGCCTGGGATCTCCCT
CCTAGTTTCGTTTCTTCTCCTGTTAGGAATTGTTTTTCAGCAATGGAAAGAAATGGAAGG
AGATCCGGCGTTTCTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATT
GAGGACYGTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACCAAGGG
TGGGTGACCCTACTCCATATCAC3'
```

Figura 12. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C9\*2

Como se señala en las Figuras 13 y 14, el fragmento esperado se sitúa a la altura correspondiente a 375 pb, este fue constatado a través del código de identificación, rs=1799853, con que se encuentra en la base de datos NCBI (49) frente al marcador de peso molecular, tanto en pacientes epilépticos como en voluntarios control.

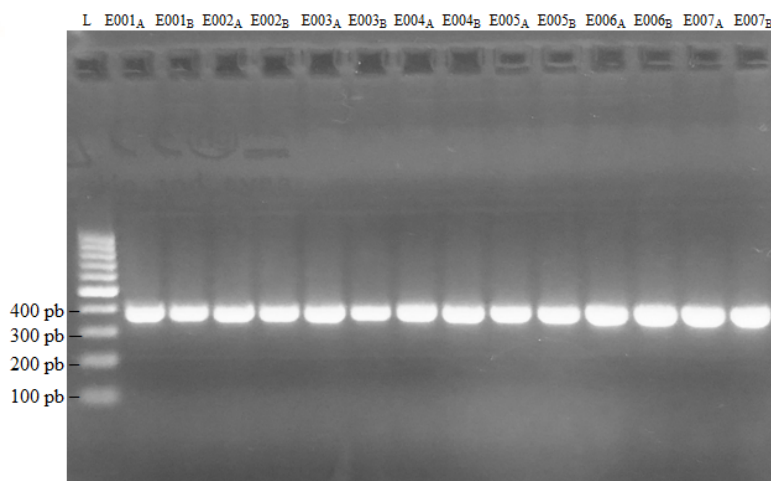


Figura 13. Amplificación genética del gen CYP2C9\*2 en Pacientes Epilépticos

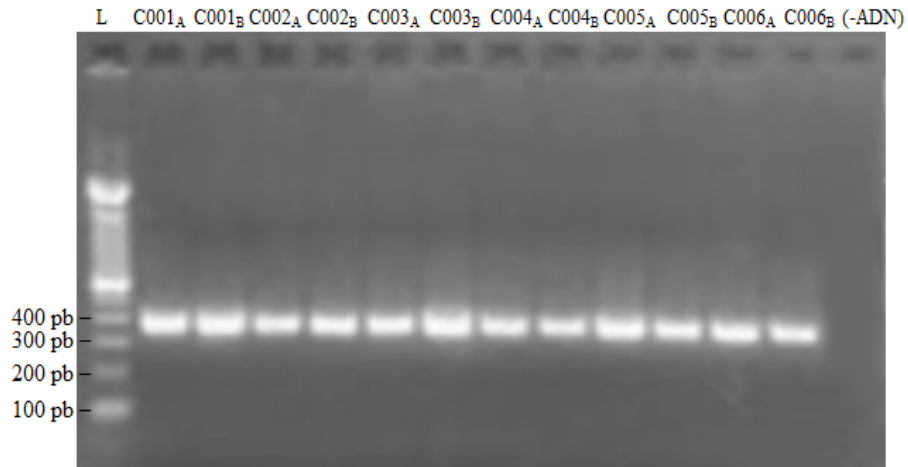


Figura 14. Amplificación genética del gen CYP2C9\*2 en Voluntarios Control

De igual manera para el gen CYP2C19 variante alélica 2, como se distingue en la Figura 15 la secuencia amplificada señala el posicionamiento del nucleótido susceptible a variación.

```
5' AATTACAACCAGAGCTTGGCATATTGTATCTATACCTTTATTAAATGCTTTTAATTT
AATAAATTATTGTTTTCTCTTAGATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTGATTATTTTC
CCRGGAACCCATAACAAATTACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATA3'
```

Figura 15. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C19\*2

Se logró amplificar la región deseada que corresponde a un fragmento de 168 pb, rs=4244285 (50), como se señala en las Figuras 16 y 17, en pacientes epilépticos y en voluntarios control respectivamente.

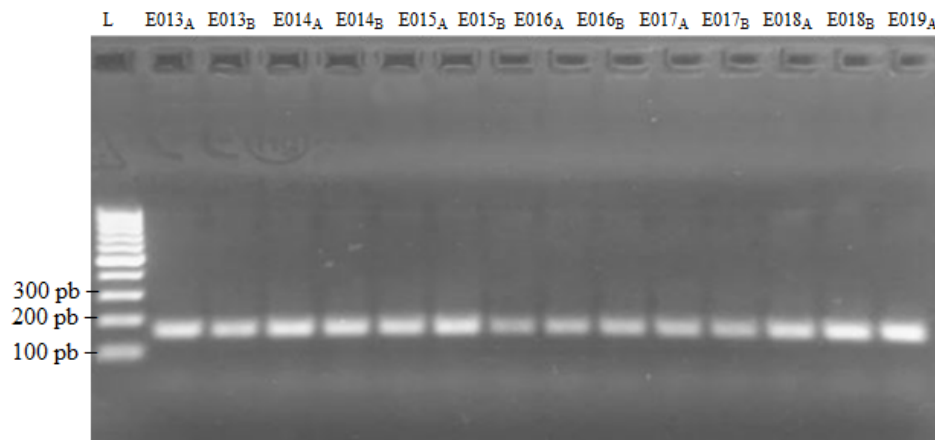


Figura 16. Amplificación genética del gen CYP2C19\*2 en Pacientes Epilépticos

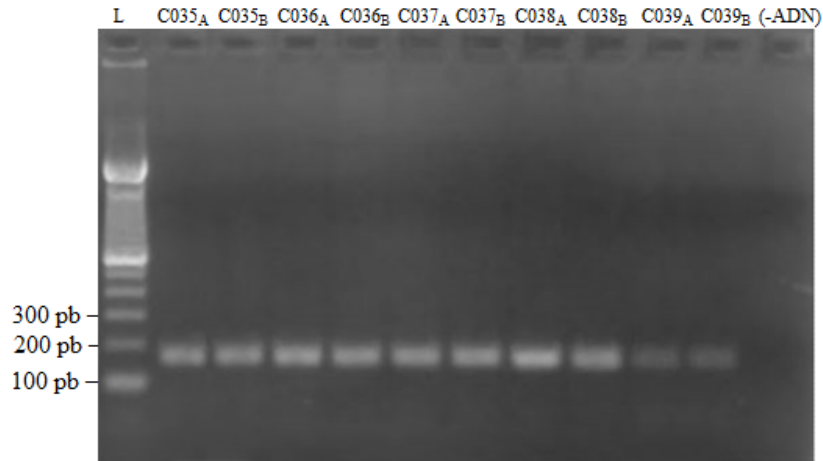


Figura 17. Amplificación genética del gen CYP2C19\*2 en Voluntarios Control  
Finalmente, la amplificación genética para la variante alélica 3 del gen CYP2C19, también mostrada en la figura 18, permite distinguir la posición específica del punto de variación.

```
5' ATTGAATGAAAACATCAGGATTGTAAGCACCCCTGRATCCAGGTAAGGCCAAGTTT
TTTGCTTCCTGAGAAACCACTTACAGTCTTTTTTTCTGGGAAATCCAAAATCTATATT
GACCAAGCCCTGAAGT3'
```

Figura 18. Secuencia Amplificada correspondiente al gen CYP2C19\*3

Se muestra así en las Figuras 19 y 20, tanto en pacientes epilépticos como en voluntarios control respectivamente, la amplificación del fragmento deseado a la altura de 132 pb, rs=4986893 (51), frente al marcador de peso molecular.

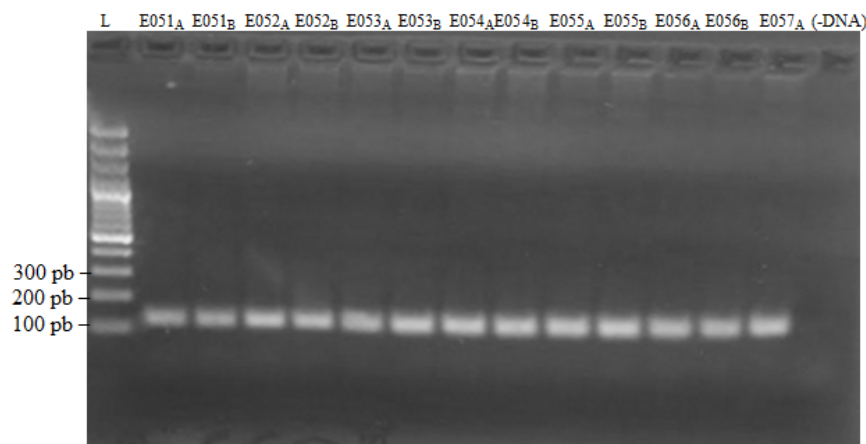


Figura 19. Amplificación genética del gen CYP2C19\*3 en Pacientes Epilépticos

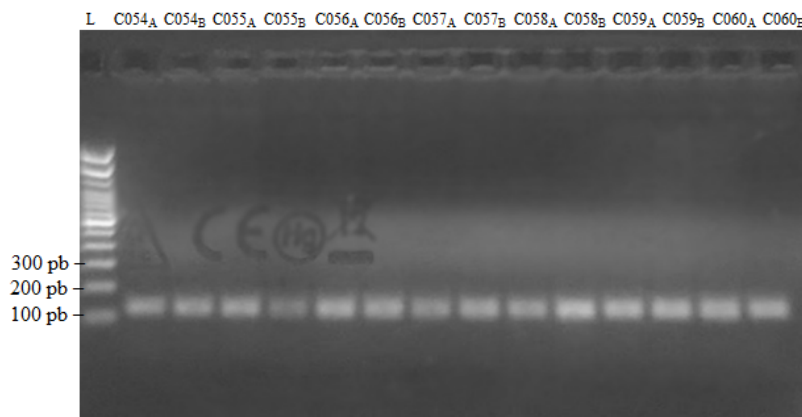


Figura 20. Amplificación genética del gen CYP2C19\*3 en Voluntarios Control

Siguiendo con la identificación de los polimorfismos, se logró digerir los productos de amplificación para los tres genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, en pacientes epilépticos y voluntarios control. Las reacciones fueron realizadas en duplicado esperando el mismo resultado en su repetición.

*Sau96I* fue la enzima de restricción utilizada para la digestión de los fragmentos amplificados para el gen CYP2C9\*2, esta es una enzima de restricción tipo II, y reconoce la secuencia bicatenaria de la forma 5'GGNCC3', escindiendo después de la primera guanina., la Figura 21 muestra como a través de la restricción virtual, se puede obtener 3 fragmentos, uno de 177 pb, otro de 119 pb y finalmente uno de 79 pb para un genotipo homocigoto de tipo silvestre, es decir que no presenta la variación alélica en la secuencia amplificada.

Enzymes: *Sau96I*

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
177	<i>Sau96I</i>	120	<i>Sau96I</i>	296	GCCCATCCAC ATGGCTGCC AGTGTGAGCT TCCTCTTCT TGCCTGGGAT CTCCCTCCTA GTTTCGTTTC TCTTCTGTT AGGAATTGTT TTCAGCAATG GAAAGAAATG GAAGGAGATC CGGCGTTTCT CCCTCATGAC GCTGCGGAAT TTTGGGATGG GGAAGAGGAG CATTGAG
119	none	1	<i>Sau96I</i>	119	CACTGGCTGA AAGAGCTAAC AGAGGATTG GTAGGTGTGC ATGTGCCTGT TTCAGCATCT GTCTTGGGGA TGGGGAGGAT GGAAAACAGA GACTTACAGA GCTCCTCGGG CAGAGCTTG
79	<i>Sau96I</i>	297	none	375	GACCGTGTTC AAGAGGAAGC CCGCTGCCTT GTGGAGGAGT TGAGAAAAAC CAAGGGTGGG TGACCCTACT CCATATCAC

Figura 21. Digestión Virtual del gen CYP2C9\*2 con la plataforma en línea *Restriction Mapper*. Genotipo homocigoto silvestre

De igual forma tras una restricción virtual para un genotipo homocigoto polimórfico, Figura 22, es decir, en este caso en particular, presenta el cambio de base nucleotídica de guanina por citosina, originando solo dos fragmentos, uno de 256 pb y otro de 119 pb en la secuencia amplificada, como se ha observado en la digestión virtual ambos casos corresponden a genotipos homocigotos, entendiéndose que el individuo posee el mismo alelo de ambos progenitores, sin embargo es muy común presenciar un genotipo heterocigoto, dado que nuestra población es mestiza, en este caso un genotipo heterocigoto presentará una combinación de ambos ejemplos de restricción, siendo así que al poseer el alelo silvestre la enzima reconozca dos sitios de corte obteniendo los tres fragmentos señalados, y a su vez al poseer el alelo polimórfico la enzima reconocerá un sitio de corte, por lo que se contará también con los dos fragmentos correspondientes; pero ya que se obtendrán en ambos casos un fragmento correspondiente a 119 pb, este se visualizara como uno solo en la corrida electroforética, es así que tras las 4 horas de incubación a 37 °C se pudo visualizar las reacciones de digestión de las muestras de pacientes epilépticos, Figura 23, mediante corridas electroforéticas, donde se logró distinguir como polimórficos a los pacientes epilépticos codificados bajo el rótulo E016, E054, E61 y E64, de los cuales E016 es el único de genotipo homocigoto, del mismo modo la Figura 24 señala la corrida electroforética correspondiente a las muestras de los voluntarios control, encontrándose solo a la muestra E078 portadora de la variación nucleotídica,

Enzymes: Sau96I

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
256	Sau96I	120	none	375	GCCCATCCAC ATGGCTGCC AGTGCAGCT TCCTCTTCT TGCTGGGAT CTCCCTCCTA GTTTCGTTTC TCTCCTGTT AGGAATTGTT TTCAGCAATG GAAAGAAATG GAAGGAGATC CGGCGTTTCT CCCTCATGAC GCTGCGGAAT TTGGGATGG GGAAGAGGAG CATTGAGGAC TGTGTTCAAG AGGAAGCCCC CTGCCTTGTG GAGGAGTTGA GAAAAACCA GGTGGGTGA CCCTACTCCA TATCAC
119	none	1	Sau96I	119	CACTGGCTGA AAGAGCTAAC AGAGGATTTG GTAGGTGTC ATGTGCCTGT TTCAGCATCT GTCTTGGGA TGGGAGGAT GAAAACAGA GACTTACAGA GCTCCTCGGG CAGAGCTTG

Figura 22. Digestión Virtual del gen CYP2C9\*2 con la plataforma en línea *Restriction Mapper*. Genotipo homocigoto polimórfico

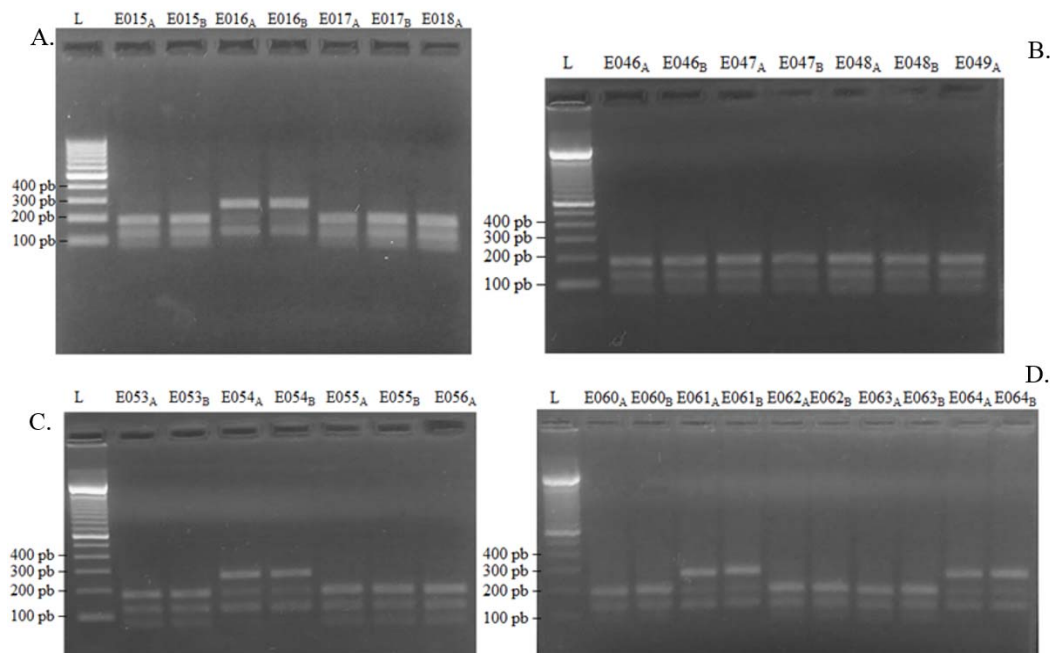


Figura 23. Digestión enzimática para el gen CYP2C9\*2 en Pacientes Epilépticos  
A. Muestra E016 con genotipo homocigoto polimórfico. B. Muestras E046 a E049 con genotipos homocigotos silvestres. C. Muestra E054 con genotipo heterocigoto polimórfico. D. Muestras E061 y E064 con genotipo heterocigoto polimórfico

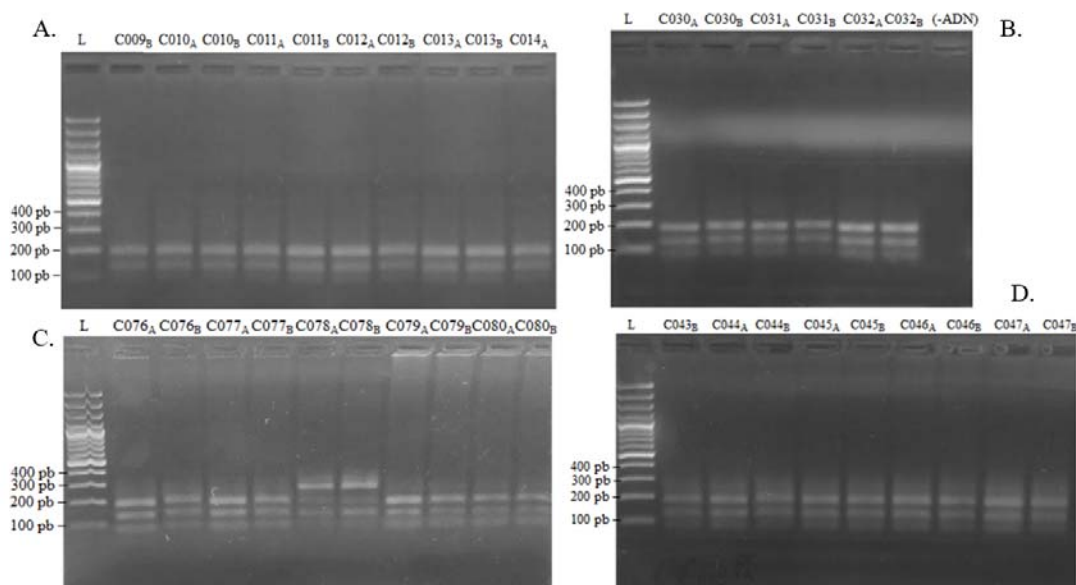


Figura 24. Digestión enzimática para el gen CYP2C9\*2 en Voluntarios Control  
A. Muestras C009 a C014 con genotipos homocigotos silvestres. B. Muestras C030 a C032 con genotipos homocigotos silvestres y en el último carril, control negativo de la reacción. C. Muestra C078 con genotipo heterocigoto polimórfico. D. Muestras C043 a C047 con genotipos homocigotos silvestres.

De igual manera para la digestión del gen CYP2C19\*2, se realizó una incubación de 4 horas con la enzima de restricción *SmaI*, a 30 °C, esta también es una enzima tipo II, que facilita la separación endonucleolítica del ADN para proporcionar fragmentos bicatenarios específicos con extremos fosfato terminales 5', al reconocer la secuencia bicatenaria de la forma 5'CCCGGG3', escindiendo después de la tercera citocina.

El sitio de reconocimiento indica a través de la digestión virtual, Figura 25, que en un genotipo homocigoto silvestre, se obtendrán dos fragmentos de 118 y 50 pb, es decir la enzima trabajará solo sobre los fragmentos de amplificación que no contengan la variante nucleotídica, siendo así que al poseerla se observa una banda correspondiente a 168 pb que es el mismo amplicón, que no ha sido digerido.

Enzymes: *SmaI*

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
118	none	1	<i>SmaI</i>	118	AATTACAACC AGAGCTTGGC ATATTGTATC TATACCTTTA TTAAATGCTT TTAATTTAAT AAATTATTGT TTTCTCTTAG ATATGCAATA ATTTTCCCAC TATCATTGAT TATTTCCC
50	<i>SmaI</i>	119	none	168	GGGAACCCAT AACAAATTAC TAAAAACCT TGCTTTTATG GAAAGTGATA

Figura 25. Digestión Virtual del gen CYP2C19\*2 con la plataforma en línea *Restriction Mapper*. Genotipo homocigoto silvestre

Como se mencionó anteriormente, en casos donde se presenta un genotipo heterocigoto, se observa tres fragmentos, dos correspondiente al alelo que ha sido identificado como silvestre o conservado y por consecuente digerido y un tercero perteneciente al alelo con la variante nucleotídica, que no ha sido digerido.

Las Figuras 26 y 27 señalan los resultados obtenidos para la digestión de muestras en pacientes epilépticos y voluntarios control respectivamente.

Para los primeros, se distinguió a las muestras rotuladas bajo el código E014, E018, E025, E034, E036, E038, E040, E041, E053 y E063 como polimórficas, de las cuales E014, E018, E025 y E053 son de genotipo homocigoto, y las restantes heterocigotas.

En cuanto a los voluntarios control los que presentaron el polimorfismo caracterizado en este caso por el cambio de nucleótido de guanina por adenina fueron las muestras rotuladas bajo el código C003, C025, C028, C030, C031, C036, C044, C048, C071 y C075, de los cuales solo E031 presenta un genotipo homocigoto.

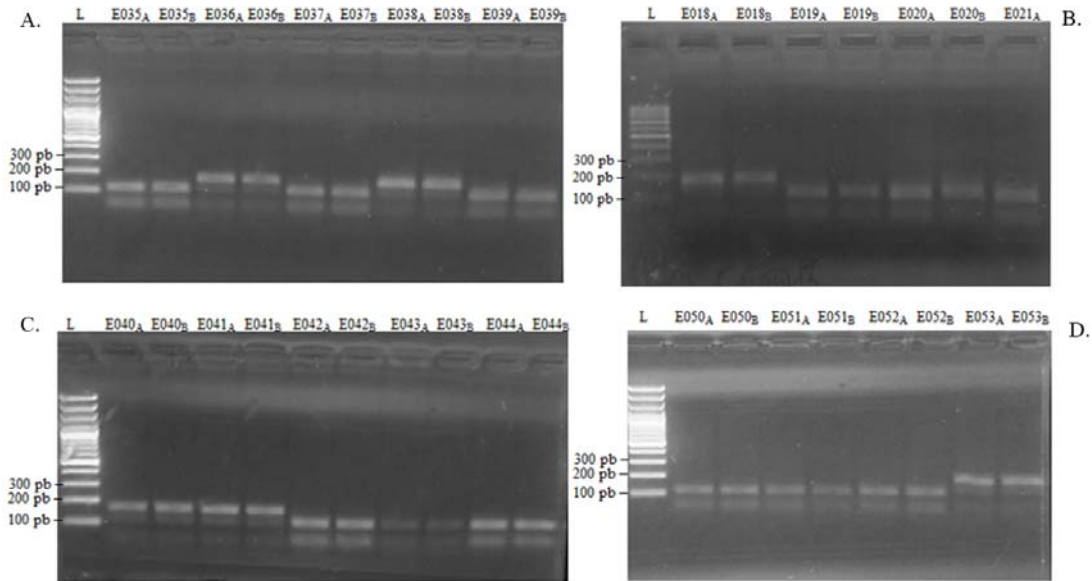


Figura 26. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*2 en Pacientes Epilépticos  
A. Muestras E036 y E038 con genotipos heterocigotos polimórficos. B. Muestra E018 con genotipo homocigoto polimórfico. C. Muestras E040 y E041 con genotipos heterocigotos polimórficos. D. Muestras E050 a E052 con genotipo homocigoto silvestre y muestra E053 con genotipo homocigoto polimórfico.

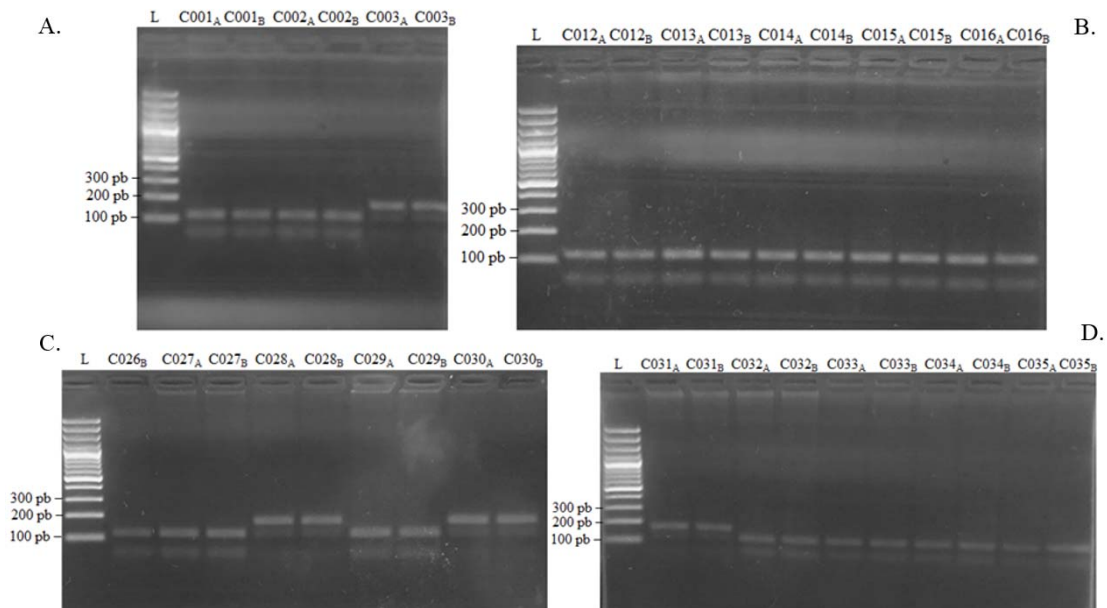


Figura 27. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*2 en Voluntarios Control  
A. Muestra C003 con genotipo heterocigoto polimórfico. B. Muestras C012 a C016 con genotipos homocigotos silvestres. C. Muestras C028 y C030 con genotipos heterocigotos polimórficos. D. Muestra C031 con genotipo homocigoto polimórfico.

Finalmente, la digestión realizada para el gen CYP2C19\*3, llevada a cabo con la enzima de restricción tipo II, *Bam*HI, tras 4 horas de incubación a 37 °C, permite procesar los fragmentos de amplificación a través del reconocimiento de la secuencia 5'GGATCC3' en la cadena bicatenaria del amplicón, provocando la escisión endonucleotídica esperada, después deonando fragmentos bicatenarios específicos con extremo terminal

A través de la digestión virtual como se ve en la Figura 28, un genotipo homocigoto silvestre, proporcionará dos fragmentos, uno de 96 pb y otro de 36 pb, al igual que *Sma*I, la enzima trabajará solo sobre los fragmentos de amplificación que no contengan la variante nucleotídica, por lo contrario al poseerla se observa una banda correspondiente a 132 pb, correspondiente al amplicón no digerido.

Enzymes: BamHI

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
96	BamHI	37	none	132	GATCCAGGTA AGGCCAAGTT TTTTGCTTCC TGAGAAACCA CTTACAGTCT TTTTTCTGG GAAATCCAAA ATTCTATATT GACCAAGCCC TGAAGT
36	none	1	BamHI	36	ATTGAATGAA AACATCAGGA TTGTAAGCAC CCCCTG

Figura 28. Digestión Virtual del gen CYP2C19\*3 con la plataforma en línea Restriction *Mapper*. Genotipo homocigoto silvestre.

Para los genotipos heterocigotos, se observa tres fragmentos, dos correspondiente al alelo que ha sido identificado como conservado y por consecuente digerido y un tercero perteneciente al alelo con la variante nucleotídica que no ha sido digerido.

La Figura 29 señala resultados obtenidos para la digestión de muestras en pacientes epilépticos, de su procesamiento se distinguió a las muestras codificadas E037 a la E050 como heterocigotas polimórficas; no hubo ningún paciente epiléptico con un genotipo homocigoto polimórfico.

En cuanto a los voluntarios control los que presentaron el polimorfismo caracterizado también en por el cambio de nucleótido de guanina por adenina fueron las muestras rotuladas bajo el código C001, C002, C003, C025, C027, C029, C059, C060, C079 y C080, que de igual presentan un genotipo homocigoto polimórfico, como se indica en la Figura 30.

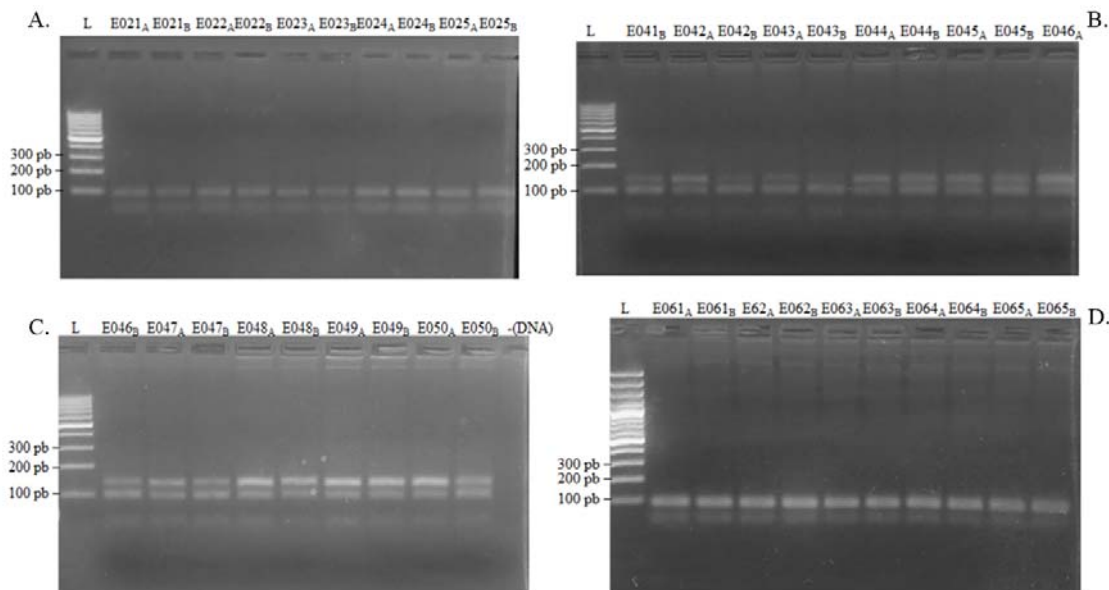


Figura 29. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*3 en Pacientes Epilépticos  
A. Muestras E021 a E025 con genotipos homocigotos silvestres. B. Muestras E041 a E046 con genotipos heterocigotos polimórficos. C. Muestras E046 a E050 con genotipos heterocigotos polimórficos y control negativo de reacción en el último carril. D. Muestras E061 a E065 con genotipos homocigotos silvestres.

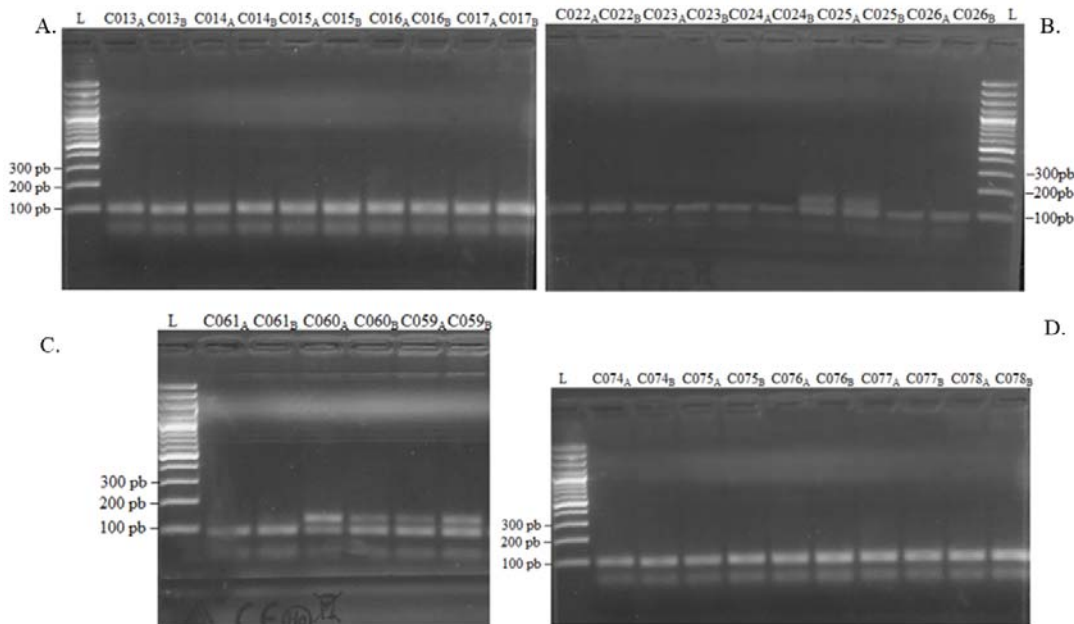


Figura 30. Digestión enzimática para el gen CYP2C19\*3 en Voluntarios Control  
A. Muestras C013 a C017 con genotipos homocigotos silvestres. B. Muestra C025 con genotipo heterocigotos polimórficos. C. Muestras E059 y E060 con genotipos heterocigotos polimórficos. D. Muestras C074 a C078 con genotipos homocigotos silvestres.

Tras la evaluación electroforética de los fragmentos de digestión enzimática, se realizó un recuento total de los genotipos de cada gen, en pacientes epilépticos y voluntarios control, logrando distinguir la distribución señalada en la Figura 31.

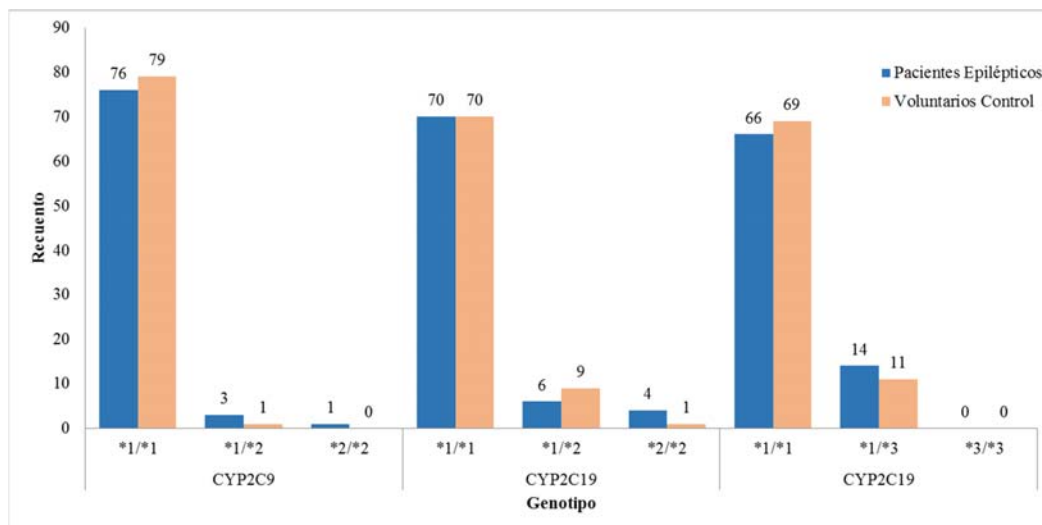


Figura 31. Distribución genotípica de Pacientes epilépticos frente a Voluntarios Control

Como se puede observar para el gen CYP2C9\*2 hay una mayor incidencia de presentar el genotipo homocigoto silvestre, también denominado bajo la forma \*1/\*1, siendo 79 individuos los que corresponden a un 98.8% del total de controles, en comparación a un 95% perteneciente a 76 pacientes epilépticos; por lo que esta diferencia se refleja en la presencia de genotipo heterocigoto polimórfico, \*1/\*2 y homocigoto polimórfico, \*2/\*2 de pacientes epilépticos, haciéndose frente un 3.75 % correspondiente a pacientes epilépticos a un 1.25% observado en voluntarios control. Además de ello, se distingue la ausencia de genotipo homocigoto polimórfico, \*2/\*2 en voluntarios control, y un 1.25% para pacientes epilépticos.

El gen CYP2C19 subtipo 2, con el genotipo homocigoto silvestre \*1/\*1 se ve en igual ocurrencia en pacientes epilépticos y voluntarios control; ambos con un recuento de 70 individuos en sus respectivos grupos lo que los hace expresarse bajo un 87.5%, para los dos casos; sin embargo los individuos restantes se distribuyen de desigual forma entre los genotipos heterocigotos polimórficos \*1/\*2, siendo estos mayores en voluntarios control, con un 11.3%, y los homocigotos polimórficos \*2/\*2, con mayor incidencia en pacientes epilépticos representado por un 7.5 % frente a un 1.25% de voluntarios control.

Por último en lo que respecta al genotipo homocigoto silvestre \*1/\*3 del gen CYP2C19 subtipo 3 se manifiesta en mayor número en los voluntarios control, representado por 69 individuos, por lo que el genotipo heterocigoto \*1/\*3 es más frecuente para pacientes epilépticos, observándose 14 casos, siendo un 17.5% del total de pacientes epilépticos, frente a 11 casos en el grupo de voluntarios control, correspondiente a un 13.8% de su total, por otro lado el genotipo homocigoto polimórfico \*3/\*3 no fue identificado en ninguno de los grupos.

### 3.4 REPORTE Y ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN PACIENTES EPILÉPTICOS Y VOLUNTARIOS CONTROL

En búsqueda de describir demográficamente la población estudiada se pudo distinguir, de los 80 pacientes epilépticos, el 50 % son mujeres y el 50 % son hombres, con una edad mínima en este grupo de 15 años y una máxima de 86 años. Del mismo modo de los 80 voluntarios control, el 56.3% son hombres y el 43.8% son mujeres, el grupo presenta una edad mínima de 18 años y una máxima de 64 años.

Tabla 6. Descripción demográfica de la población analizada

	Pacientes Epilépticos		Voluntarios Control	
	N	%	N	%
Mujeres	40	50	35	56.3
Hombres	40	50	45	43.8
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Edad	15	86	18	64

La descripción estadística de un polimorfismo radica, primeramente, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que se traduce a estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se consideran directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para evaluar las frecuencias alélicas, se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo (54).

A fin de establecer un soporte y poder conocer la magnitud de la presencia o no de un determinado polimorfismo sobre la población, es que se recurre a procesar las frecuencias como variables cuantitativas y así poder saber el impacto que representa, a continuación la Tabla 7, permite distinguir diferencias entre las frecuencias genotípicas, bajo la división intergrupar de la variable categórica de sexo. Se identificó las frecuencias genotípicas y alélicas para el gen CYP2C9\*2, los genotipos encontrados fueron establecidos en los pacientes epilépticos y voluntarios control, distinguiendo frecuencias intergrupales, entre hombres y mujeres de cada grupo, así como un total, cabe destacar que para un genotipo homocigoto silvestre, \*1/\*1 se ha encontrado mayor frecuencia en hombres que en mujeres, desarrollando el polimorfismo solo mujeres, y esto se manifiesta tanto en pacientes epilépticos como en voluntarios control, así mismo la incidencia sobre un genotipo heterocigoto polimórfico, \*1/\*2, es mayor en mujeres epilépticas, 3.75%, frente a las pertenecientes a los voluntarios control, 2.86%, y el genotipo homocigoto polimórfico, \*2/\*2 con un 1.25%, únicamente presente en mujeres del grupo de pacientes epilépticos, valga la aclaración, no se puede referir a esta incidencia del polimorfismo genético del CYP2C9\*2 en mujeres como un caso de segregación ligada al sexo, ya que dicho gen se encuentra en un cromosoma autosómico, sin embargo las perturbaciones de un solo gen presentan varias formas básicas de transmisión genética; como lo son autosómica dominante, autosómica recesiva, y la transmisión genética mitocondrial; la cual afecta tanto a hombres como a mujeres, pero sólo se verían afectadas a la transmisión las mujeres, porque las mitocondrias de todo individuo provienen de sus madres; este tipo de segregación puede aparecer en todas las generaciones. (55), siendo este un posible caso de este tipo de segregación, de igual manera bajo el criterio de disposición intergrupar por sexo, se diferenciaron las frecuencias genotípicas entre hombres y mujeres para el gen CYP2C19 subtipo 2; si bien para el genotipo homocigoto silvestre \*1/\*1, se ha observado valores próximos entre pacientes epilépticos y voluntarios control, con un 90% frente a un 91.1% para hombres con epilepsia y hombres control, respectivamente, y un 85% a un 82.9% en mujeres con epilepsia, la distribución dentro de lo que respecta a hombres y mujeres no es muy lejana, siendo esta variación aparentemente similar en genotipos \*1/\*1 y \*1/\*2, sin embargo en este último se identificó una mayor incidencia en mujeres control con un 17.14% y la presencia del genotipo homocigoto polimórfico \*2/\*2, fue observada en un 2.5% en hombres con epilepsia, frente 2.22% de hombres control, a su vez las mujeres control no presentaron el genotipo nombrado, el cual si se manifestó en mujeres epilépticas en un 7.5 %, finalmente, en lo que respecta al gen CYP2C19 subtipo 3, se

presenta ausencia del genotipo homocigoto polimórfico \*3/\*3 tanto en pacientes epilépticos como en voluntarios control, por lo que la distribución entre el genotipo homocigoto silvestre \*1/\*1 y heterocigoto polimórfico, \*1/\*3, se aprecia sin mucha diferencia entre hombres y mujeres de cada grupo, rescatando salvo el 15% para hombres con epilepsia, frente a un 6.67% de hombres control en el genotipo heterocigoto polimórfico \*1/\*3.

Tabla 7. Descripción de la distribución genotípica por sexo para los genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3 en pacientes epilépticos y voluntarios control

	Pacientes epilépticos				Voluntarios control			
	Hombres		Mujeres		Hombres		Mujeres	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>CYP2C9*2</b>								
*1/*1 CC	40	100	36	90	45	100	34	97.1
*1/*2 CT	0	0	3	3.75	0	0	1	2.86
*2/*2 TT	0	0	1	1.25	0	0	0	0
	40	100	40	100	45	100	35	100
<b>CYP2C19*2</b>								
*1/*1 GG	36	90	34	85	41	91.1	29	82.9
*1/*2 GA	3	7.5	3	7.5	3	6.67	6	17.14
*2/*2 AA	1	2.5	3	7.5	1	2.22	0	0
	40	100	40	100	45	100	35	100
<b>CYP2C19*3</b>								
*1/*1 GG	34	85	32	80	42	93.3	27	77.14
*1/*3 GA	6	15	8	20	3	6.67	8	22.85
*3/*3 AA	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	100	40	100	45	100	35	100

En la población de estudio, ninguno de los individuos fue homocigoto para el polimorfismo CYP2C19\*3, los genotipos y las frecuencias alélicas de CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, no difirieron significativamente en los pacientes epilépticos en comparación con los voluntarios control, como se muestra en la Tabla 8; considerando un valor P de significancia del 0.05 y contemplando el valor OR como la razón que relaciona el riesgo del evento entre los grupos propuestos (56); siendo así que se pudo identificar a la presencia de las variantes genotípicas y alélicas como factores de riesgo no significativo, sin embargo CYP2C19\*2, con el genotipo heterocigoto polimórfico\*1/\*2, sugeriría su presencia como un factor protector a pesar de ello, no es significativo (OR = 0.64, IC 95% 0.22-1.89, P = 0.42).

Tabla 8. Análisis de frecuencia genotípica y alélica en Pacientes Epilépticos y Voluntarios Control

Genotipo	Pacientes epilépticos N=80 (%)	Voluntarios control N=80 (%)	Nivel de Significancia P	OR (95 % IC)
<b>CYP2C9*2</b>				
*1/*1 CC	76 (95.0)	79 (98.8)		
*1/*2 CT	3 (3.8)	1 (1.3)	0.33	3.08 (0.31-30.24)
*2/*2 TT	1 (1.3)	0 (0.0)	0.50	3.04 (0.12-75.70)
Frecuencia *1	0.97	0.99		
Frecuencia *2	0.03	0.01	0.34	3.06 (0.31-29.95)
<b>CYP2C19*2</b>				
*1/*1 GG	70 (87.5)	70 (87.5)		
*1/*2 GA	6 (7.5)	9 (11.3)	0.42	0.64 (0.22-1.89)
*2/*2 AA	4 (5.0)	1 (1.3)	0.21	4.16 (0.45-38.05)
Frecuencia *1	0.91	0.93		
Frecuencia *2	0.09	0.07	0.60	1.31 (0.47-3.68)
<b>CYP2C19*3</b>				
*1/*1 GG	66 (82.5)	69 (86.3)		
*1/*3 GA	14 (17.5)	11 (13.8)	0.51	1.33 (0.56-3.14)
*3/*3 AA	0 (0.0)	0 (0.0)		
Frecuencia *1	0.91	0.93		
Frecuencia *3	0.09	0.07	0.60	1.31 (0.47-3.68)

Lakhan et al (3), realizó el análisis de los mismos polimorfismos genéticos del CYP2C9 y CYP2C19, observando también el efecto protector de la variante genética de CYP2C9\*2, sugiriendo que los fenotipos polimórficos asociados a metabolizadores lentos (ML), en pacientes epilépticos, impedirían desarrollar resistencia a variados fármacos, como se muestra en la Tabla 9, este efecto también fue observado en genotipos de pacientes epilépticos clasificados con resistencia frente a respondedores, CYP2C9 \*1/\*2, (OR = 0.67, IC 95% 0.06-7.67, P = 0.75), CYP2C19 \*2/\*2, (OR = 0.43, IC 95% 0.043-4.37, P = 0.48) y CYP2C19 \*1/\*3, (OR = 0.7, IC 95% 0.21-2.35, P = 0.57), , sin embargo los valores obtenidos no fueron significativos. En CYP2C19, se identificó también el efecto protector asociado al riesgo de presentar las variantes alélicas \*2 y \*3, (OR = 0.68, IC 95% 0.25-

1.86,  $P = 0.45$ ); aunque no se presentó asociación significativa, probablemente no se descarta de encontrar significancia en la relación genotípica y alélica en CYP2C9 y CYP2C19, en una muestra poblacional mayor.

Tabla 9. Análisis de frecuencia genotípica y alélica en Pacientes Epilépticos Farmacorresistentes y Farmacorrespondedores

	Farmacorresistente N=34 (%)	Farmacorrespondedor N=46 (%)	Nivel de Significancia P	Odds Ratio (OR)
<b>CYP2C9*2</b>				
*1/*1	32 (94.1)	44 (95.7)		
*1/*2	1 (2.9)	2 (4.3)	0.75	0.67 (0.06-7.67)
*2/*2	1 (2.9)	0 (0.0)	0.37	4.16 (0.16-105.4)
*1	0.96	0.98	0.42	2.04 (0.37-11.41)
*2	0.04	0.02		
<b>CYP2C19*2</b>				
*1/*1	30 (88.2)	40 (86.6)		
*1/*2	3 (8.8)	3 (6.5)	0.7	1.39 (0.26-7.33)
*2/*2	1 (2.9)	3 (6.5)	0.48	0.43 (0.043-4.37)
*1	0.93	0.9	0.45	0.68 (0.25-1.86)
*2	0.07	0.1		
<b>CYP2C19*3</b>				
*1/*1	29 (85.3)	37 (80.4)		
*1/*3	5 (14.7)	9 (19.6)	0.57	0.7 (0.21-2.35)
*3/*3	0 (0.0)	0 (0.0)		
*1	0.93	0.9	0.45	0.68 (0.25-1.86)
*3	0.07	0.1		

Existen varios otros factores que influyen en la capacidad de respuesta al tratamiento del FAE recientemente administrado y dependen en gran medida del historial de tratamiento pasado, estos factores pueden ser el tipo de epilepsia, la duración de las convulsiones y el número de ataques previos al inicio de la terapia farmacológica, también pueden ser responsables de las diferencias en la capacidad de respuesta del fármaco. La resistencia a los medicamentos es un fenotipo complejo que resulta de la contribución de numerosos genes, además de las enzimas metabolizadoras de fármacos, las diferencias en los transportadores de los mismos, como barreras intestinales y hematoencefálicas; así como la expresión del gen MDR1 (ABCB1) y MRP2 también influye en la disposición de

fármacos como carbamazepina y fenitoína y se puede así explicar la variabilidad de farmacocinética interindividual (57).

Un genotipo homocigoto silvestre, se asocia a un fenotipo ME, es decir un metabolizador eficiente, un genotipo heterocigoto polimórfico, se vincula a un fenotipo denominado MI, metabolizador intermedio, y un genotipo homocigoto polimórfico, se interpreta como un fenotipo ML, metabolizador lento, bajo este enunciado se pretendería establecer que la respuesta al fármaco se vería afectada en caso de presentarse determinada variación polimórfica, sin embargo, esto podría ser reforzado con la cuantificación del fármaco en plasma, así mismo siguiendo la distribución de frecuencia de los genotipos observados en la población control, se señala que los relacionados a los voluntarios control, cumplen con el equilibrio de Hardy Weinberg, al presentar un valor de  $X^2=0$  que corresponde a una p de 1 para CYP2C9\*2,  $X^2=1.18$  que corresponde a una p de 0.2774 en CYP2C19\*2, y  $X^2=0.44$  que corresponde a una p de 0.5071 para CYP2C19\*3, sin embargo, cuando se sometió a los pacientes epilépticos al equilibrio de Hardy Weinberg,  $X^2=11.59$  presentó un valor que corresponde a una p de 0.0007 para CYP2C9\*2, y en CYP2C19\*2 se obtuvo un  $X^2=22.5$  que corresponde a una p de 0.0001, por lo que se distingue claramente que los genotipos de ambos genes se encontraron en un margen de desequilibrio significativo, por otro lado CYP2C19\*3 presentó un  $X^2=0.74$  que corresponde a una p de 0.3897, siendo este el único gen con genotipos en equilibrio, la ley de Hardy-Weinberg establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio en el loci autosómicos tras una generación, es por ello que se debe realizar el equilibrio primeramente en los controles del estudio (58), se dice que una población está en equilibrio cuando los alelos de los sistemas polimórficos mantienen su frecuencia en la población a través de las generaciones. Para lograr el equilibrio genético, este debería cumplir condiciones como, una población infinitamente grande que provenga de apareamientos al azar, sin selección, es decir, cada genotipo bajo consideración debe haber podido sobrevivir tan bien como cualquier otro siendo posible que este se refleje en la progenie, y finalmente no debe existir flujo génico, es decir, debe tratarse de una población cerrada donde no haya inmigración ni emigración, sin embargo, estas consideraciones son ideales y en un escenario real se pueden observar fluctuaciones aleatorias en las frecuencias génicas dado el tamaño finito de la población estudiada, este es considerado como un error

de muestreo intergeneracional conocido como deriva génica. Así mismo dentro de las consideraciones de selección, nuestra población y en general la realidad de cruzamiento se puede definir como exogámica, y esto va de la mano con la migración de la que hemos sido participes, dando lugar a la introducción de nuevas variedades génicas en la población, a pesar de estas consideraciones la mayoría de los genes se comportan dentro de límites estadísticamente aceptables con las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, este es un enunciado teórico, representando una situación estática en la que la estructura génica de una población no cambia, por lo que al presentar las características de una población fuera del equilibrio, su no cumplimiento implicaría la acción de fuerzas evolutivas en dicha población.

### 3.5 RELACIÓN DEL ESTADO POLIMÓRFICO DE LOS GENES DEL CITOCROMO P450, CYP2C9\*2 Y CYP2C19\*2 Y \*3 CON OTRAS POBLACIONES

Las frecuencias alélicas de los genes estudiados, fueron comparadas con las de otras poblaciones, como lo señala la Tabla 10, con fines descriptivos demográficos, asociando así su presencia a la influencia de poblaciones representativas reportadas.

Tabla 10. Comparación de las frecuencias alélicas de CYP2C9 y CYP2C19 en distintas poblaciones.

Población	CYP2C9		CYP2C19			Referencia
	*1	*2	*1	*2	*3	
Mexicana	0.95	0.04	0.82	0.09	0.0	(59)
Turca	0.79	0.10	0.88	0.12	0.004	(60)
Marroquí	0.91	0.09	0.88	0.11	0.0	(61)
China	0.98	0.0	0.66	0.28	0.04	(62)
Japonesa	0.98	0.0	0.54	0.35	0.11	(63)
Española	0.86	0.13	0.86	0.12	0.003	(64)
Africana	0.94	0.06	0.84	0.16	0.04	(65)
Población estudiada	0.98	0.02	0.92	0.08	0.08	

Se pudo distinguir que la frecuencia asociada a CYP2C9\*1 en la población en estudio, es la misma que la reportada en la población china y japonesa, y guarda cercana relación con la mexicana, por otro lado el alelo polimórfico, CYP2C9\*2, no se ha presentado en

asiáticos, y nuestra población exhibe valores menores al presente en mexicanos, marroquíes e incluso africanos, con frecuencias de 0.04, 0.09 y 0.06 respectivamente.

El alelo silvestre CYP2C19\*1 en nuestra población está por encima de la frecuencia de todas las poblaciones señaladas en la Tabla 10, y su variante polimórfica CYP2C19\*2, es próxima a la reportada en mexicanos 0.09. Finalmente, la frecuencia para el alelo silvestre del gen CYP2C19\*3 es menor pero cercana a la reportada en japoneses.

Existen diferencias importantes entre los principales grupos étnicos, en este sentido, CYP2C9 \* 2, ha sido detectado con mayor frecuencia en españoles (13%) que en africanos (6%) o poblaciones asiáticas, hasta tal punto que, la variante alélica \*2 de CYP2C9, no se ha encontrado en diferentes grupos de Asia oriental (62). Un perfil interétnico similar se muestra a través de la comparación de la prevalencia de CYP2C19 \* 3 entre las poblaciones contribuyendo con una predominancia de la presencia de esta variante en la población japonesa; por el contrario, CYP2C19 \* 2, es el alelo con una frecuencia relativamente alta entre las poblaciones mencionadas lo que los autores señalan como una característica genotípica de los diferentes grupos étnicos, que indica que esta mutación es relativamente antigua y ocurrió antes de la diferenciación de los tres grandes grupos raciales, conocidos como negros, asiáticos y caucásicos (64), esto refuerza el valor de 0.09 y 0.08 correspondientes a las frecuencias de la población mexicana y la estudiada respectivamente, que al ser regiones principalmente mestizas, con un flujo cultural notable poseen una frecuencia alélica para CYP2C19\*2 considerablemente baja.

Las variaciones alélicas observadas como próximas entre las poblaciones señaladas evidencian el flujo genético y desarrollo evolutivo.

## CAPÍTULO IV

## 4. CONCLUSIONES

1. Se identificó los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP's), del citocromo P450, correspondiente a los genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3 en pacientes epilépticos.
2. El método de extracción por columnas en fase sólida, permitió una adecuada extracción del material genético, reflejándose en los resultados de cantidad y calidad; siendo estos de 37.86 ng/ $\mu$ L de ADN genómico en promedio, para las muestras de pacientes epilépticos, y un promedio de 45.03 ng/ $\mu$ L para las muestras de voluntarios control, en cuanto a la calidad, evaluada por espectrofotometría, con la relación A260:A280 nm, se obtuvo para los pacientes epilépticos una relación promedio de 1.85, y para voluntarios control el promedio de esta misma relación fue de 1.86, además de bandas íntegras tras la evaluación electroforética.
3. Se logró la detección de los polimorfismos en los genes CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, identificando los genotipos posibles en cada uno de ellos, a través de la técnica de PCR-RFLP, mediante la amplificación de sus regiones correspondientes; por lo que tras el análisis electroforético, CYP2C9\*2, se visualizó como una banda de 375 pb, que tras incubación con la enzima de restricción *Sau96I* proporcionó fragmentos de 177, 119 y 79 pb para un genotipo homocigoto silvestre, y fragmentos de 119 y 256 pb en un genotipo homocigoto polimórfico, a su vez CYP2C19\*2 tras amplificación, proporcionó un fragmento de 168 pb, que digerido con la enzima *SmaI*, dio lugar a fragmentos de 118 y 50 pb para un genotipo homocigoto silvestre, y por último, la amplificación de CYP2C19\*3, con un fragmento correspondiente a 132 pb, digerido con la enzima de restricción *BamHI*, se obtuvo fragmentos de 96 y 36 pb, para genotipos homocigotos silvestres, además tanto CYP2C19\*2 y \*3, no presentan sitio de restricción para sus respectivas enzimas en genotipos polimórficos. El análisis no manifestó diferencia significativa entre los pacientes epilépticos y voluntarios control con respecto a la presencia de las variantes polimórficas en los genotipos CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, por su parte, el genotipo heterocigoto CYP2C19\*2 sugirió un efecto protector no significativo para los pacientes epilépticos frente a los voluntarios control, por otro lado dentro del grupo de pacientes epilépticos no se presentó diferencia significativa entre los pacientes epilépticos farmacorresistentes y

farmacorrespondedores, con respecto a la presencia de las variantes polimórficas en los genotipos pertenecientes a CYP2C9\*2, CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3, siendo así que los genotipos, homocigoto CYP2C19\*2 y heterocigoto CYP2C19\*3, sugirieron un efecto protector no significativo en los pacientes epilépticos farmacorresistentes frente a farmacorrespondedores

4. El reporte de las frecuencias alélicas en la población estudiada hace referencia a un 97 % para el alelo silvestre en CYP2C9\*2 en pacientes epilépticos, así mismo se reportó un 3% para el alelo polimórfico de dicho gen, de igual manera para CYP2C19\*2 se distinguió un 91 % en referencia al alelo silvestre y un 9 % en relación al alelo polimórfico, finalmente para CYP2C19\*3 se reportó un 9% de frecuencia para el alelo polimórfico, esta incidencia frente a la observada en voluntarios control, no señaló diferencia significativa, por su parte las frecuencias alélicas de CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3 presentaron un efecto protector no significativo entre pacientes epilépticos farmacorresistentes frente a farmacorrespondedores, así mismo el reporte de las frecuencias genotípicas en la población estudiada hace referencia a un 95 % para el genotipo homocigoto silvestre, 3.8 % relacionado al genotipo heterocigoto polimórfico y 1.3% para el genotipo homocigoto polimórfico del gen CYP2C9\*2; para el CYP2C19\*2 se reportó una frecuencia del 87.5 % para el genotipo homocigoto silvestre, 7.5 % para el genotipo heterocigoto polimórfico y 5% para el genotipo homocigoto polimórfico, finalmente se observó la incidencia del 82.5 % del genotipo homocigoto silvestre, 17.5 % del genotipo heterocigoto polimórfico, y 0 % del genotipo homocigoto polimórfico en el gen CYP2C19\*3; las distribuciones de frecuencias de genotipo observadas en los voluntarios control, no mostraron una desviación significativa del equilibrio Hardy Weinberg., mientras que las distribuciones de frecuencias de genotipo observadas en los pacientes epilépticos, mostraron una desviación significativa de este.
5. Las frecuencias alélicas observadas en nuestra población con respecto a reportes en poblaciones mexicanas, turcas, marroquíes, chinas, japonesas, españolas y africanas, sugieren encontrarse próximas con las frecuencias reportadas para poblaciones asiáticas (chinas y japonesas), respecto al gen CYP2C9\*2 y CYP2C19\*3 y mexicanas para el gen CYP2C19\*2. lo que se interpreta como un flujo genético y desarrollo evolutivo para nuestra población influenciado por estas poblaciones.

## CAPÍTULO V

### 5. RECOMENDACIONES

1. Es pertinente y complementario al estudio, realizar un dosaje en suero, de los fármacos antiepilépticos que en general consumen los pacientes epilépticos, para así lograr establecer y esclarecer la relación de la presencia del polimorfismo sobre un fenotipo determinado.
2. Los objetivos farmacológicos han sugerido que la clase principal de genes responsables de la capacidad de respuesta de los fármacos que incluyen, pero no se limitan a, canales de sodio, canales de calcio, canales de potasio y receptores de GABA, por lo tanto, el efecto genético general de estos genes puede tener un papel importante en la determinación de la respuesta del fármaco en lugar del efecto de un solo gen y sus polimorfismos genéticos.
3. Las frecuencias genotípicas observadas se desvían en forma significativa en el equilibrio de Hardy Weinberg, sugiriendo eventos significativos a nivel de fuerzas evolutivas, lo cual puede ser digno de posteriores estudios.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco V, Perucca E. The pharmacogenomics of epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 3 de octubre de 2015;15(10):1161-70.
2. Julio Espinoza Jimenez. Manual de Epilepsia [Internet]. Red Voltaire. [citado 6 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.voltairenet.org/article167420.html>
3. Lakhan R, Kumari R, Singh K, Kalita J, Misra UK, Mittal B. Possible role of CYP2C9 & CYP2C19 single nucleotide polymorphisms in drug refractory epilepsy. *Indian J med res*. 2011;7.
4. Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmöller J, Schlagenhauser R, Bauer S, Szekeres T, et al. The predictive value of MDR1, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J*. marzo de 2001;1(3):204-10.
5. Morais SM de, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*. 6 de marzo de 1994;269(22):15419-22.
6. Berg H. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. En: Magdeldin S, editor. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [Internet]. InTech; 2012 [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>
7. Salazar Montes Adriana María, Sandoval Rodríguez Ana Soledad, Armendáriz Borunda Juan, editores. *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Primera Edición. México, D.F.: Mc Graw Hill; 2013. 322 p.
8. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: new advances. *The Lancet*. marzo de 2015;385(9971):884-98.
9. Epilepsia [Internet]. World Health Organization. [citado 3 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

10. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. abril de 2014;55(4):475-82.
11. Engelborghs s, d'hooge r, deyn ppd. Pathophysiology of epilepsy. :14.
12. Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI. Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy [Internet]. American Epilepsy Society; 2006 [citado 17 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2510/>
13. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. abril de 2017;58(4):512-21.
14. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. abril de 2017;58(4):522-30.
15. Torres CV. *Epilepsia. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. marzo de 2015;11(73):4364-73.
16. López-González R. Epilepsia, tratamiento farmacológico y su monitoreo epilepsy, pharmacological treatment and monitoring. *Rev Cúpula*. 2016;30(2):44-53.
17. Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo MV, Farre MR, García B, et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farm Hosp*. noviembre de 2011;35(6):326-39.
18. Mercadé Cerdá JM, Mauri Llerda JA, Becerra Cuñat JL, Parra Gomez J, Molins Albanell A, Viteri Torres C, et al. Pronóstico de la epilepsia. Inicio del tratamiento crónico farmacológico. *Neurología*. julio de 2015;30(6):367-74.
19. Greenberg RG, Melloni C, Wu H, Gonzalez D, Ku L, Hill KD, et al. Therapeutic index estimation of antiepileptic drugs: a systematic literature review approach. *Clin Neuropharmacol*. 2016;39(5):232-40.
20. Fernández JLH. Tratamiento antiepiléptico. Vigilancia y controles. :7.

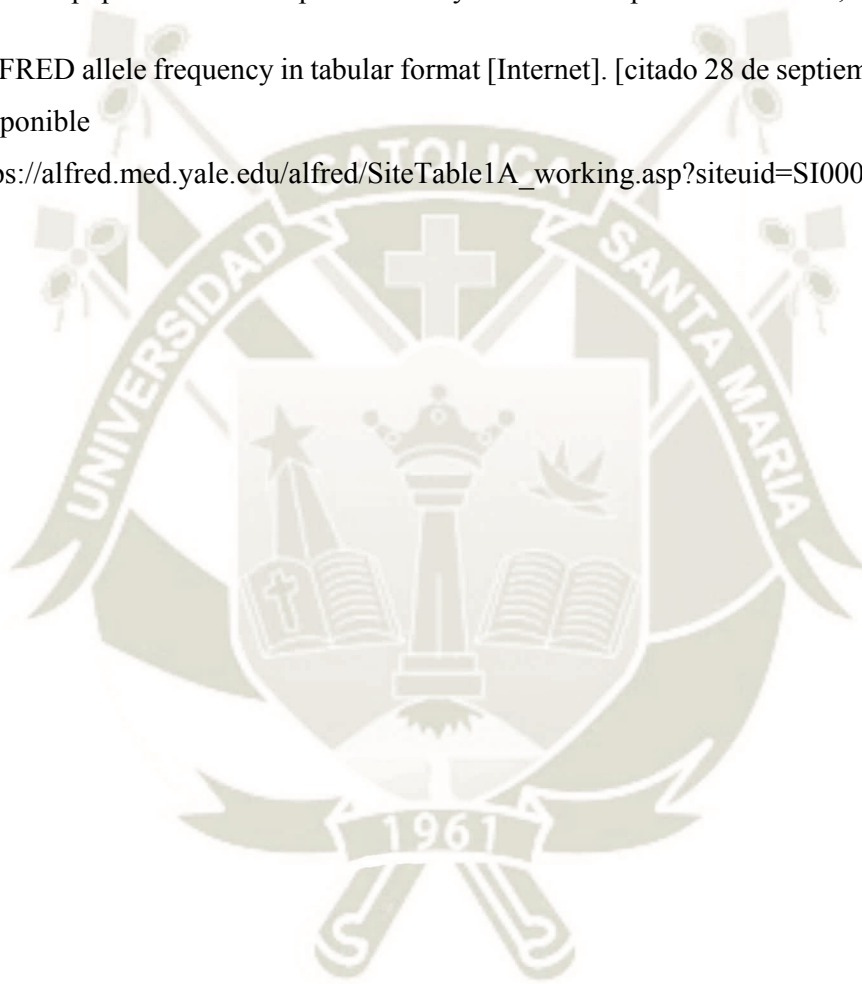
21. Yacubian EMT, Contreras-Caicedo G, Ríos-Pohl L. Farmacológico de las Epilepsias. :297.
22. Donato MT. 1. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? 2009;34.
23. González R, César J, Rodeiro Guerra I. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. Rev Cuba Farm. septiembre de 2014;48(3):495-507.
24. Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. Structure. 1 de enero de 1995;3(1):41-62.
25. Guengerich FP. Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem. 5 de junio de 2018;jbc.TM118.004144.
26. Danielson PB. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. :37.
27. PORTUGAL MTM, GUALIX YJ. 3. Polimorfismo de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica. :32.
28. Ortiz DM, Carranza RC, Ramírez AMD. Modulación de la expresión de enzimas del citocromo p450 hepáticas durante las etapas fetal y pediátrica. 2012;12.
29. Gordeziani MS, Varazi TG, Pruidze MV. Structural–functional organization of cytochrome P450 containing monooxygenase and some aspects of modeling. Ann Agrar Sci. 1 de junio de 2016;14(2):82-94.
30. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. Curr Drug Targets [Internet]. 5 de enero de 2018 [citado 1 de julio de 2018];19(1). Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/149505/article>
31. Beledo JF, Simón JAA, Martínez ÁM, editores. Metabolismo de los fármacos. En: Farmacología humana. 6.<sup>a</sup> ed. Elsevier España; 2013. p. 87-100.
32. Daly A, Rettie A, Fowler D, Miners J. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. J Pers Med. 28 de diciembre de 2017;8(1):1.

33. CYP2C9 gene homepage - Global Variome shared LOVD [Internet]. [citado 1 de julio de 2018]. Disponible en: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/CYP2C9>
34. PharmVar [Internet]. [citado 2 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.pharmvar.org/genes>
35. Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*. enero de 2009;50(1):1-23.
36. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* [Internet]. diciembre de 2015 [citado 11 de septiembre de 2018];8(1). Disponible en: <http://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-015-0115-z>
37. Leaché AD, Oaks JR. The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2 de noviembre de 2017;48(1):69-84.
38. Saldaña-Cruz AM, Sánchez-Corona J, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE. Farmacogenética y metabolismo de fármacos antiepilépticos: implicación de variantes genéticas en citocromos P450. *Rev Neurol*. :9.
39. Zhou S-F, Zhou Z-W, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology*. diciembre de 2010;278(2):165-88.
40. Feng J, Li L, Zhao Y-S, Tang S-Q, Yang H-B, Liu S-X. Interaction between CYP 2C19\*3 polymorphism and smoking in relation to laryngeal carcinoma in the Chinese Han population. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):3331-7.
41. Morin PA, Luikart G, Wayne RK, the SNP workshop group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol*. abril de 2004;19(4):208-16.
42. Gerard J. Allan, Tmara L. Max. *Molecular Genetic Techniques and Markers for Ecological Research | Learn Science at Scitable*. 2010 [citado 11 de septiembre de 2018];3(10). Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/molecular-genetic-techniques-and-markers-for-ecological-15785936#>

43. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) [Internet]. [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>
44. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) [Internet]. [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techcaps/>
45. Velázquez LPA. Extracción y purificación de ADN. :26.
46. [citado 21 de junio de 2018]. Disponible en: [http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_AN\\_Purificacion&opc=tecnicas&idap=36](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=tecnicas&idap=36)
47. Buckingham L, Flaws ML. Nucleic Acid Extraction Methods. En: Molecular diagnostics: fundamentals, methods, & clinical applications. Philadelphia: F.A. Davis; 2007. p. 76-7.
48. Montes AMS, Rodríguez ASS, Borunda JSA, editores. Electroforesis. En: Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 1.<sup>a</sup> ed. México, D.F.: McGraw Hill Interamericana; 2013. p. 110-9.
49. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1799853 \*\* With drug-response allele \*\* [Internet]. [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1799853](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799853)
50. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4244285 \*\* With drug-response allele \*\* [Internet]. [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=4244285](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4244285)
51. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs4986893 \*\* With drug-response allele \*\* [Internet]. [citado 28 de junio de 2018]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=4986893](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4986893)
52. Chaudhary N, Kabra M, Gulati S, Gupta YK, Pandey RM, Bhatia BD. Frequencies of CYP2C9 polymorphisms in North Indian population and their association with drug levels in children on phenytoin monotherapy. BMC Pediatr [Internet]. diciembre de 2016 [citado 30 de julio de 2018];16(1). Disponible en: <http://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-016-0603-0>

53. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 3 p.
54. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit. agosto de 2005;19(4):333-41.
55. Alliance G, ScreeningServices TNY-M-AC for G and N. Patrones hereditarios [Internet]. Genetic Alliance; 2009 [citado 24 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132213/>
56. Cerda J, Vera C, Rada G. Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. Rev Médica Chile. octubre de 2013;141(10):1329-35.
57. Mittal B, Kumari R, Lakhan R, Garg R, Kalita J, Misra U. Pharmacogenomic association study on the role of drug metabolizing, drug transporters and drug target gene polymorphisms in drug-resistant epilepsy in a north Indian population. Indian J Hum Genet. 2011;17(4):32.
58. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. Am J Epidemiol. 15 de febrero de 2009;169(4):505-14.
59. Ortega-Vázquez A, Dorado P, Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, Monroy-Jaramillo N, Martínez-Juárez IE, et al. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 genetic polymorphisms and phenytoin plasma concentrations in Mexican-Mestizo patients with epilepsy. Pharmacogenomics J. junio de 2016;16(3):286-92.
60. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schröder T, et al. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. Clin Pharmacol Ther. agosto de 1999;66(2):185-92.
61. Afilal D, Basselam MA, Brakez Z, Chouham S, Brehm A, Izaabel EH. Genetic Polymorphism of Drug-Metabolizing Enzymes *CYP2C9* and *CYP2C19* in Moroccan Population. Genet Test Mol Biomark. mayo de 2017;21(5):298-304.
62. Wang S-L, Huang J, Lai M-D, Tsai J-J. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese: Pharmacogenetics. febrero de 1995;5(1):37-42.

63. Kimura M, Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Higuchi S. Genetic polymorphism of cytochrome P450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit.* junio de 1998;20(3):243-7.
64. Vicente J, González-Andrade F, Soriano A, Fanlo A, Martínez-Jarreta B, Sinués B. Genetic polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 in Ecuadorian Mestizo and Spaniard populations: a comparative study. *Mol Biol Rep.* marzo de 2014;41(3):1267-72.
65. ALFRED allele frequency in tabular format [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2018]. Disponible en: [https://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A\\_working.asp?siteuid=SI000386R](https://alfred.med.yale.edu/alfred/SiteTable1A_working.asp?siteuid=SI000386R)



## 7. ANEXOS

### ANEXO 1. PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

1. Invitar al paciente a sentarse.
2. Poner el brazo del paciente sobre la mesa de trabajo, de preferencia apoyándolo en un pequeño cojín bajo el codo, con la palma de la mano hacia arriba.
3. Colocar la aguja en la jeringa, tocando solo la base de la aguja. Asegurarse que la aguja y jeringa no estén obstruidas.
4. Aplicar la ligadura en el brazo, por encima del punto ubicado para la extracción de la sangre.
5. Pedir al paciente que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación.
6. Palpar con el dedo índice la vena en que se introducirá la aguja.
7. Desinfectar la piel con algodón embebido en etanol al 70%
8. Colocar la aguja sobre la vena, con el bisel hacia arriba, introducir la aguja en el centro de la vena, sin dudar.
9. Obtener la sangre jalando el embolo de la jeringa lentamente.
10. Desligar el brazo del voluntario una vez obtenidas las muestras.
11. Antes de retirar la aguja, colocar algodón donde se encuentra sumergida la punta de la aguja. Retirar la aguja con mucho cuidado.
12. Vaciar la muestra obtenida en tubos que contenga anticoagulante EDTA.
13. Rotular los tubos con el nombre del voluntario, código asignado y fecha de colección de la muestra.

## ANEXO 2. PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CELULAS SANGUÍNEAS

Método empleado: Método de Fase sólida con Columnas de Sílica.

Kit: Kit innuPREP Blood DNA Mini Kit, analytikjena

Muestra: Sangre periférica (400 uL)

1. Añadir 400 uL de la muestra de sangre entera en un tubo de reacción de 2ml (Tubo eppendor)
2. Añadir al tubo de reacción 400 uL de la solución de lisis SLS y 30 UI de proteinasa K y mezclar vigorosamente por 10 segundos, con la ayuda del vortex
3. Incubar la muestra a 60°C por 10 minutos.
4. Terminada la incubación, añadir al tubo de reacción 700 uL de la solución de unión BL, y mezclar cuidadosamente por pipeteo de 3 a 4 veces
5. Añadir 750 uL de la mezcla a la columna de sílica colocada dentro de un tubo de colección, proporcionados por el kit.
6. Centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto
7. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de colección
8. Añadir la mezcla residual en la columna del tubo de reacción en la columna y volver a centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.
9. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de colección.
10. Añadir 400 uL de la solución de lavado C a la columna y centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto
11. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de colección.
12. Añadir 600 uL de la solución de lavado BS y centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto. Descartar el filtrado y rehusar el tubo de colección; añadir nuevamente 600 uL de la solución de lavado BS y volver a centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.
13. Descartar el tubo de colección con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de colección.

14. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos, para remover todas las trazas de etanol. Desacartar el tubo de colección
15. Colocar la columna en un tubo de elución, y añadir 200 uL del Buffer de elución, previamente pre-calentado a 60 °C, e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto
17. Desechar la columna, almacenar la muestra a -20°C.



### ANEXO 3. PREPARACIÓN DE ESTANDARES Y LECTURA DE CONTRACCIÓN DE ADN POR FLUOROMETRÍA

1. Preparar la solución de trabajo, en un tubo falcon de 15 ml, diluyendo el reactivo Qubit® dsDNA BR en una relación 1: 200, en el Qubit® dsDNA BR Buffer.
2. Preparar el volumen suficiente de la solución de trabajo para los dos estándares y muestras que se vayan a cuantificar.
3. Para los estándares, agregar 190  $\mu$ L de la solución de trabajo, a dos tubos de PCR
4. Añadir 10  $\mu$ L del estándar N°1 a uno de los tubos de PCR que contiene la solución de trabajo y mezclar con ayuda del vortex de 2 a 3 segundos; del mismo modo preparar el estándar N°2.
5. Incubar ambos estándares por 2 minutos a temperatura ambiente y proceder a la lectura en el equipo.
6. Seleccionar en la pantalla del equipo la opción de DNA, seleccionar dsDNA BR, seleccionar la opción para leer estándares.
7. Insertar el tubo que contiene el estándar n. ° 1 en la cámara de muestra, cerrar la tapa y presionar leer
8. Insertar el tubo que contiene el estándar n. ° 2 en la cámara de muestra, cerrar la tapa y presionar leer.
9. Agregar 199  $\mu$ L de la solución de trabajo a los tubos de PCR que contendrán las muestras a cuantificar.
10. Agregar 1  $\mu$ L de muestra, mezclar agitando en vortex de 2 a 3 segundos.
11. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
12. Insertar el tubo que contiene la muestra en el equipo, cerrar la tapa y presionar leer, luego de obtener la lectura retirar el tubo y proceder de la misma forma con las demás muestras.

#### ANEXO 4. PROTOCOLO PARA ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Pesar 0.15g de agarosa en 15ml de buffer TAE 1X, para un gel 1%; 0.3 g para un gel 2% y 0.375 para un gel 2.5%.
2. Mezclar y calentar al microondas la solución hasta la completa disolución.
3. Añadir 2uL de SYBR® safe DNA stain y mezclar.
4. Colocar la solución en el molde con el peine para la formación de pozos.
5. Dejar gelificar a temperatura ambiente.
6. Colocar el gel en la cámara de electroforesis con 300ml de buffer TAE 0,5X.
7. El gel se coloca de polo negativo a polo positivo para permitir la migración adecuada de los ácidos nucleicos.
8. Colocar en un trozo de papel parafilm 2uL de loading dye buffer INVITROGEN, añadir 8uL de muestra y homogenizar la mezcla.
9. Cargar la muestra teñida en el respectivo pozo del gel, cuidadosamente.
10. En el caso de analizar productos de PCR o productos de digestión; cargar el marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher SCIENTIFIC) en uno de los pozos.
11. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis con los electrodos insertados en la fuente de poder.
12. Programar las condiciones de corrida de acuerdo a la muestra que se esté analizando (voltaje y tiempo de corrida).
13. Visualizar el gel en el transiluminador UV.

**ANEXO 5. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y SEGUIMIENTO A PACIENTES**

**Proyecto de Investigación:** IDENTIFICACION Y EVALUACION DE LOS  
POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (SNPs) MDR1 Y CYP450 3A4 Y 2C9,  
FRENTE A LA RESISTENCIA A FARMACOS ANTIEPILEPTICOS EN PACIENTES  
PERUANOS.

**II. FILIACION**

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: M F Estado Civil: \_\_\_\_\_

**III. DATOS CLINICOS**

1. Diagnóstico de Epilepsia:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Año del Diagnóstico: \_\_\_\_\_

2. Medicación Anterior

Medicamento	
Dosis	
Fecha	

3. Medicación Actual

Medicamento		
Dosis		
Fecha		
Cumple el Tratamiento	SI	NO

4. Electroencefalograma:

Fecha		
Resultado	NORMAL	ANORMAL

5. Otros Diagnósticos y/o Tratamientos:

---

---

---

6. Observaciones:

---

---

---



## ANEXO 6. CONSENTIMIENTO LIBRE INFORMADO

Versión: 04  
Vigente desde: 29/12/2017  
Página 1 de 4

Laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular - UCSM

### CONSENTIMIENTO LIBRE INFORMADO

Fecha de consentimiento informado: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

*Antes de leer este Consentimiento Libre Informado, por favor LEA DETENIDAMENTE el documento, así también Ud. está en el derecho de consultar con familiares o amigos según lo requiera sobre el llenado del documento; REALICE LAS PREGUNTAS NECESARIAS a las personas que le han proporcionado el consentimiento, para poder comprender lo que pretende el grupo de investigación, ellos están en la OBLIGACIÓN de responder cualquier consulta por parte de Uds.*

#### 1. INFORMACION SOBRE LA INVESTIGACION

**Título:** Identificación y evaluación de los Polimorfismos de nucleótido único (SNPS) MDR1 y CYP450 3A4 y 2C9, frente a la resistencia a fármacos antiepilépticos en pacientes peruanos.

**Institución de investigación:** Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

**Investigadores envueltos:** Mgtr. Julitza Paredes (Investigador Principal); Dra. Rita Nieto (Co-Investigadora), Dra. Karin Vera (Co-Investigadora), Ing. José Carpio (Co-Investigadora), José Villanueva PhD. (Coordinador General), Isabel Camargo (Coordinador Médico).

**Comité de Ética:** Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas del Perú (INCN).

- Contacto: Dra. María Meza Vega, Presidenta del Comité de Ética del INCN.
- Correo Electrónico: [mariamezavega@gmail.com](mailto:mariamezavega@gmail.com)
- Jr. Ancash 1271, Barrios Altos, Cercado de Lima.
- Teléfono 51 1 4117700.

**Evaluación del riesgo:** Mínimo

#### 2. INFORMACIONES AL VOLUNTARIO

**Descripción resumida del proyecto:** Los posibles cambios en su DNA que se transmiten de una generación a otra, se llaman polimorfismos, que ocurren cuando el DNA muta (cambia) en las células que se transmiten a los descendientes; algunos polimorfismos están involucrados en el desarrollo, susceptibilidad o baja respuesta al tratamiento de una enfermedad. Este proyecto pretende determinar el polimorfismo de nucleótido único (SNPS) de los genes MDR1 y CYP450 3A4 y CYP450 2C9, que están relacionados con la resistencia a fármacos prescritos para la epilepsia en pacientes peruanos participantes pre-seleccionados que participarán en el estudio de investigación. Para ello será necesario, la toma de dos tipos de muestra; sangre total y células bucales; para la determinación plasmática del antiepiléptico y para la extracción del DNA.

**Importancia del Estudio:** El presente estudio pretende dar un mejor tratamiento al paciente Epiléptico, sugiriendo al médico la cantidad de fármaco necesario para que su organismo lo



MINISTERIO DE SALUD  
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas  
Fecha de Aprobación: 29.12.17  
Fecha de Caducidad: 28.12.18  
Dra. MARIA MEZA VEGA  
Presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación

1

Laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular - UCSM

asimile y otorgue una mejor respuesta frente a la enfermedad, finalmente dando una adecuada Calidad de vida.

**Procedimientos:** Para ser incluido en el estudio usted será sometido a exámenes simples de laboratorio, como la toma de una muestra de sangre y toma de células bucales.

La colecta de sangre para exámenes clínicos y moleculares serán realizadas por el Laboratorio de Biología Molecular, localizado en el pabellón H-401 de la Universidad Católica de Santa María, esta muestra servirá para determinar la cantidad de fármaco antiepiléptico presente en el plasma (componente de la sangre) del paciente, así también para analizar las posibles variantes en sus genes.

El procedimiento de la toma de muestra sanguínea, será realizado por personal Profesional y Técnico del grupo de Investigación (Biólogo, Enfermera y Técnicos de Laboratorio), capacitados para llevar a cabo dicha acción. **Adicionalmente, no es necesario que esté en ayuno para la obtención de estas muestras.**

Para la toma de muestra, usted (el paciente) será acomodado en una silla especial para toma de muestras, se le extraerá 6mL de sangre venosa del brazo, este procedimiento se llevará a cabo empleando la técnica convencional por punción y recolección de la sangre en un tubo especial y serán rotulados con códigos numerados, salvaguardando la confidencialidad del paciente. Los materiales empleados serán totalmente estériles y nuevos, de uso exclusivo para cada paciente (el procedimiento sigue las normas descritas en el Manual de Procedimientos de Laboratorio, del Ministerio de Salud del Perú). Luego con la ayuda de un citocepillo adecuado estéril (parecido a un hisopo), se hará la colecta de la muestra de células bucales, raspando cuidadosamente el interior de las mejillas de cada paciente, la muestra será colectada en un tubo pequeño estéril. Ambas muestras serán rotuladas con códigos numerados, salvaguardando la confidencialidad del paciente.



Las muestras obtenidas (sangre y células bucales) serán almacenadas en cadena de frío (4°C a 8°C) y transportadas hacia el laboratorio en contenedores especiales.

**Veces que se tomarán las muestras:** Para analizar los cambios en los genes se tomara una sola vez dicha muestra (venopunción y toma de células bucales). Para determinar la cantidad de fármaco antiepiléptico presente en el plasma (componente de la sangre) del paciente, se tomarán 3 muestras que serán realizadas de la siguiente manera: Primera muestra al inicio del estudio, Segunda Muestra a los 6 meses, Tercera muestra a los 12 meses.

**NOTA:** Para la recolección de la Segunda y Tercera muestra para evaluar la cantidad de fármaco antiepiléptico presente en el plasma (componente de la sangre), el equipo de investigación se comunicará con el paciente vía telefónica y concertarán una cita, según horarios disponibles del paciente.

**Ocurrencia de posibles riesgos:** El único posible efecto indeseable, que se podría presentar durante la colecta de sangre, es que algunas personas puedan sentir debilidad y mareos por causa del pinchazo. También se podría presentar sangrado excesivo y la formación de Hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel). Sin embargo, esos efectos son pasajeros y no son graves; la extracción de las muestras como ya se mencionó estarán a cargo de personal con experiencia y debidamente capacitado.

MINISTERIO DE SALUD  
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas  
Fecha de Aprobación 29.12.17  
Fecha de Caducidad 28.12.18  
Dra. MARIA MEZA VEGA  
Presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación

2

Laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular - UCSM

**Beneficios esperados:** Este proyecto tiene como beneficio promover una terapia personalizada, lo que significa recibir un tratamiento en base a medicamentos y concentraciones adecuados a su organismo, lo cual se logrará al conocer sus características genéticas que puedan estar influyendo en el éxito de su terapia.

**Métodos alternativos existentes:** Los dos tipos de muestras que se han escogido (Sangre Total y Células Bucales, como ya se mencionó anteriormente), son de fácil acceso, ya que se obtienen a través de métodos de extracción sencillos y frecuentes.

Sin embargo existen otras muestras biológicas con las cuales se pueden realizar estas pruebas como Biopsias, orina, heces. El problema con usar este tipo de muestras es que sus resultados no sean precisos y no podamos cumplir con los objetivos de este proyecto.

**Forma de acompañamiento y asistencia:** Los investigadores estarán a disposición de los participantes para cualquier aclaración con respecto a la toma de muestra y sus análisis en los teléfonos: 945448653 (Mgtr. Julitza Paredes); 987421813 (Dra. Rita Nieto), 945733860 (Dra. Karin Vera), 962358099 (Ing. José Carpio).

**Garantía de privacidad (confidencia):** En la divulgación de los resultados de la investigación, los participantes serán identificados por códigos, garantizando su privacidad.

*Las muestras genéticas (DNA), que se obtengan de las células sanguíneas de los participantes, SERÁN SOLAMENTE DE USO EXCLUSIVO PARA ESTA INVESTIGACIÓN DURANTE LOS AÑOS 2017 – 2018, finalizada la investigación (2018), las muestras serán eliminadas así se descartamos que estas muestras no serán usadas en otro estudio.*

**Otras aclaraciones:**

- Usted tendrá garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda que pueda surgir, en cualquier etapa del estudio, y también tendrá la libertad de retirar su consentimiento y salir del estudio en el momento en que lo desee.
- El equipo de Investigación en Neurociencias y Biología Molecular de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, se compromete a destruir las muestras de cada paciente luego de ser usadas para alcanzar los objetivos en este proyecto. Asegurándonos de que estas muestras no serán usadas en estudios posteriores.
- Este trabajo de investigación NO ha considerado reembolsos económicos hacia los participantes por concepto de pasajes y/o alimentación ya que, las muestras que se les tomará serán cuando ellos acudan a sus citas Control en el Departamento de Neurología del Hospital, indicadas por su médico tratante.



MINISTERIO DE SALUD  
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas  
Fecha de Aprobación 29/12/17  
Fecha de Caducidad 28/12/18  
Dra. MARIA MEZA VEGA  
Presidenta del Comité Institucional de ética en investigación

Versión: 04  
Vigente desde: 29/12/2017  
Página 4 de 4

Laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular - UCSM

*Después de haber sido debidamente informado(a) sobre la justificativa y objetivos del proyecto y de los procedimientos a los que será sometido, y recibir la garantía de ser esclarecido sobre cualquier duda y de tener la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento, consiento, de libre y espontánea voluntad, en participar de la investigación "Identificación y evaluación de los Polimorfismos de nucleótido único (SNPS) MDR1 y CYP450 3A4 y 2C9, frente a la resistencia a fármacos antiepilépticos en pacientes peruanos".*

Voluntario

DNI:

Investigador

DNI:



.....  
...  
**SOLO PARA LLENAR EN CASO DE RETIRARSE DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Yo, \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_, deseo retirarme del Trabajo de Investigación "Identificación y evaluación de los Polimorfismos de nucleótido único (SNPS) MDR1 y CYP450 3A4 y 2C9, frente a la resistencia a fármacos antiepilépticos en pacientes peruanos".

Voluntario

DNI:

Investigador

DNI:

4

MINISTERIO DE SALUD  
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas  
Fecha de Aprobación 29.12.17  
Fecha de Caducidad 28.12.18  
Dra. MARIA MEZA VEGA  
Presidenta del Comité Institucional de ética en investigación

ANEXO 7. CONCENTRACIÓN DE ADN GENÓMICO EN PACIENTES EPILÉPTICOS

Código	Concentración DNA <sub>A</sub> (ng/uL)	Concentración DNA <sub>B</sub> (ng/uL)	Código	Concentración DNA <sub>A</sub> (ng/uL)	Concentración DNA <sub>B</sub> (ng/uL)
E001	28	26,2	E041	276	48,6
E002	14,28	17,74	E042	50	76,6
E003	12,98	29,4	E043	10,84	9,6
E004	18,8	25,8	E044	324	28,4
E005	27	25	E045	12,64	14,62
E006	21,4	24,4	E046	31	34,8
E007	17,56	15	E047	16,08	18,64
E008	23,4	23,2	E048	44	55,6
E009	20,4	16,66	E049	37,4	41
E010	20	28	E050	21,2	24,6
E011	20,4	18,58	E051	6,38	7,08
E012	18,08	17,1	E052	120	6,3
E013	20,8	21,4	E053	28	19,36
E014	18,16	17,22	E054	120	106
E015	40,2	9,92	E055	19,12	21,6
E016	28	25,4	E056	120	26,4
E017	22	26,8	E057	33,4	39,2
E018	28,8	28,4	E058	26,8	27,8
E019	31,2	40	E059	29	20
E020	15,34	13,86	E060	25	34,6
E021	8,64	12,14	E061	24,2	17,48
E022	12,38	10,46	E062	24	4,64
E023	13,86	14,2	E063	7,14	5,7
E024	31,8	15,4	E064	27,2	38,8
E025	38,6	20,4	E065	21,6	24,2
E026	43	29,4	E066	26,8	22,2
E027	26,8	22	E067	18,48	19,32
E028	57,2	38,6	E068	21	39,4
E029	39	36,4	E069	25,4	30,4
E030	35	49	E070	14,2	120
E031	30,4	39,4	E071	31,6	30,2
E032	29,2	42,8	E072	120	114
E033	57,6	40	E073	15,96	13,7
E034	62	16,88	E074	6,36	10,8
E035	130	58,2	E075	120	17,28
E036	56	132,8	E076	61	7,36
E037	256	53,4	E077	15,8	8,38
E038	25,2	196,4	E078	34,8	29,6
E039	25,6	26,2	E079	17,36	15,22
E040	18,36	21,4	E080	17,86	57,6

ANEXO 8. CONCENTRACIÓN DE ADN GENOMICO VOLUNTARIOS CONTROL

Código	Concentración DNA <sub>A</sub> (ng/uL)	Concentración DNA <sub>B</sub> (ng/uL)	Código	Concentración DNA <sub>A</sub> (ng/uL)	Concentración DNA <sub>B</sub> (ng/uL)
C001	200	73	C041	12,58	17,46
C002	180,4	168	C042	18,3	9,46
C003	169,8	78,8	C043	28	27,4
C004	183,4	176	C044	18	21,4
C005	32,8	38,4	C045	21	25
C006	46,8	17,36	C046	24,6	26,2
C007	30,4	39,4	C047	22,2	30,6
C008	20,2	27,4	C048	28	31,2
C009	11,08	15,04	C049	24,2	27
C010	39,6	120	C050	56,4	15,98
C011	32,8	25,2	C051	22,8	21
C012	35	32,2	C052	120	40,6
C013	26,4	31,8	C053	114	57,2
C014	33,8	28,4	C054	26,6	11,82
C015	120	42,8	C055	24,6	120
C016	82,2	43	C056	114	35
C017	3,36	11,58	C057	33	15,32
C018	4,18	34	C058	23,8	12,34
C019	4,62	6,9	C059	31	34,2
C020	7,36	3,72	C060	17,44	23,8
C021	5,66	51,8	C061	14,02	39,2
C022	120	3,9	C062	30,2	38
C023	33,2	22	C063	59,2	31
C024	22,2	50	C064	30	120
C025	23,4	22,2	C065	60	77,6
C026	11,28	21	C066	21	20,8
C027	40,4	120	C067	32,8	16,8
C028	6,76	5,54	C068	30,2	8,02
C029	41,6	120	C069	54,8	37,4
C030	21,2	38,2	C070	37	61,6
C031	120	120	C071	13,58	24,6
C032	99,4	52	C072	23,6	16,66
C033	23	120	C073	30,6	27,8
C034	30	21,8	C074	15,56	93,4
C035	19	16,94	C075	120	9,48
C036	55,6	33,6	C076	13,22	14,1
C037	22,2	37,8	C077	12,64	20
C038	18,88	32,2	C078	89	21,4
C039	28,4	30,2	C079	120	120
C040	14,26	22,4	C080	120	120

**ANEXO 9. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN GENÓMICO DE PACIENTES  
EPILEPTICOS**

<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>	<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>
<b>E001<sub>A</sub></b>	0.0037	0.002	1.87	<b>E041<sub>A</sub></b>	0.0035	0.0018	1.94
<b>E001<sub>B</sub></b>	0.0073	0.0037	1.96	<b>E041<sub>B</sub></b>	0.0167	0.0092	1.82
<b>E002<sub>A</sub></b>	0.0544	0.0279	1.95	<b>E042<sub>A</sub></b>	0.0020	0.0011	1.86
<b>E002<sub>B</sub></b>	0.0140	0.0075	1.86	<b>E042<sub>B</sub></b>	0.0119	0.0064	1.86
<b>E003<sub>A</sub></b>	0.0195	0.0099	1.97	<b>E043<sub>A</sub></b>	0.0139	0.0078	1.78
<b>E003<sub>B</sub></b>	0.0125	0.0073	1.71	<b>E043<sub>B</sub></b>	0.0116	0.006	1.93
<b>E004<sub>A</sub></b>	0.0199	0.0109	1.83	<b>E044<sub>A</sub></b>	0.0118	0.0063	1.87
<b>E004<sub>B</sub></b>	0.0019	0.001	1.87	<b>E044<sub>B</sub></b>	0.0127	0.007	1.81
<b>E005<sub>A</sub></b>	0.0440	0.0233	1.89	<b>E045<sub>A</sub></b>	0.0385	0.0225	1.71
<b>E005<sub>B</sub></b>	0.0038	0.0019	1.99	<b>E045<sub>B</sub></b>	0.0172	0.01	1.72
<b>E006<sub>A</sub></b>	0.0073	0.0041	1.78	<b>E046<sub>A</sub></b>	0.0212	0.0120	1.77
<b>E006<sub>B</sub></b>	0.0036	0.002	1.82	<b>E046<sub>B</sub></b>	0.0223	0.0125	1.79
<b>E007<sub>A</sub></b>	0.0109	0.0057	1.92	<b>E047<sub>A</sub></b>	0.0048	0.0025	1.93
<b>E007<sub>B</sub></b>	0.0035	0.002	1.76	<b>E047<sub>B</sub></b>	0.0132	0.0071	1.86
<b>E008<sub>A</sub></b>	0.0123	0.0063	1.95	<b>E048<sub>A</sub></b>	0.0080	0.0040	2
<b>E008<sub>B</sub></b>	0.0063	0.0036	1.76	<b>E048<sub>B</sub></b>	0.0067	0.0037	1.82
<b>E009<sub>A</sub></b>	0.0034	0.002	1.72	<b>E049<sub>A</sub></b>	0.0208	0.0109	1.91
<b>E009<sub>B</sub></b>	0.0057	0.003	1.91	<b>E049<sub>B</sub></b>	0.0121	0.0071	1.71
<b>E010<sub>A</sub></b>	0.0100	0.0055	1.81	<b>E050<sub>A</sub></b>	0.0102	0.0059	1.73
<b>E010<sub>B</sub></b>	0.0073	0.004	1.83	<b>E050<sub>B</sub></b>	0.0037	0.002	1.83
<b>E011<sub>A</sub></b>	0.0093	0.0054	1.72	<b>E051<sub>A</sub></b>	0.0037	0.002	1.84
<b>E011<sub>B</sub></b>	0.0116	0.0064	1.82	<b>E051<sub>B</sub></b>	0.0030	0.0017	1.79
<b>E012<sub>A</sub></b>	0.0065	0.0037	1.75	<b>E052<sub>A</sub></b>	0.0305	0.0153	1.99
<b>E012<sub>B</sub></b>	0.0093	0.0047	1.97	<b>E052<sub>B</sub></b>	0.0130	0.0071	1.83
<b>E013<sub>A</sub></b>	0.0087	0.0048	1.81	<b>E053<sub>A</sub></b>	0.0003	0.0002	1.76
<b>E013<sub>B</sub></b>	0.0048	0.0025	1.92	<b>E053<sub>B</sub></b>	0.0011	0.0006	1.72
<b>E014<sub>A</sub></b>	0.0153	0.0088	1.74	<b>E054<sub>A</sub></b>	0.0028	0.0015	1.85
<b>E014<sub>B</sub></b>	0.0040	0.0023	1.74	<b>E054<sub>B</sub></b>	0.0011	0.0006	1.87
<b>E015<sub>A</sub></b>	0.0059	0.0031	1.91	<b>E055<sub>A</sub></b>	0.0040	0.0022	1.8

<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>	<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>
<b>E015<sub>B</sub></b>	0.0120	0.0061	1.96	<b>E055<sub>B</sub></b>	0.0168	0.0087	1.93
<b>E016<sub>A</sub></b>	0.0105	0.0059	1.78	<b>E056<sub>A</sub></b>	0.0167	0.0088	1.9
<b>E016<sub>B</sub></b>	0.0039	0.0021	1.88	<b>E056<sub>B</sub></b>	0.0082	0.0047	1.75
<b>E017<sub>A</sub></b>	0.0032	0.0017	1.89	<b>E057<sub>A</sub></b>	0.0023	0.0012	1.92
<b>E017<sub>B</sub></b>	0.0016	0.0008	1.99	<b>E057<sub>B</sub></b>	0.0032	0.0016	1.97
<b>E018<sub>A</sub></b>	0.0031	0.0017	1.85	<b>E058<sub>A</sub></b>	0.0081	0.0047	1.7
<b>E018<sub>B</sub></b>	0.0033	0.0017	1.96	<b>E058<sub>B</sub></b>	0.0029	0.0016	1.84
<b>E019<sub>A</sub></b>	0.0019	0.001	1.91	<b>E059<sub>A</sub></b>	0.0040	0.0023	1.72
<b>E019<sub>B</sub></b>	0.0040	0.002	1.98	<b>E059<sub>B</sub></b>	0.0095	0.0055	1.72
<b>E020<sub>A</sub></b>	0.0018	0.001	1.78	<b>E060<sub>A</sub></b>	0.0021	0.0011	1.96
<b>E020<sub>B</sub></b>	0.0002	0.0001	1.92	<b>E060<sub>B</sub></b>	0.0299	0.01672	1.79
<b>E021<sub>A</sub></b>	0.0039	0.002	1.95	<b>E061<sub>A</sub></b>	0.0447	0.02234	2
<b>E021<sub>B</sub></b>	0.0006	0.0003	1.95	<b>E061<sub>B</sub></b>	0.0030	0.0016	1.85
<b>E022<sub>A</sub></b>	0.0071	0.004	1.78	<b>E062<sub>A</sub></b>	0.0035	0.0019	1.85
<b>E022<sub>B</sub></b>	0.0012	0.0007	1.75	<b>E062<sub>B</sub></b>	0.0051	0.00258	1.96
<b>E023<sub>A</sub></b>	0.0027	0.0014	1.94	<b>E063<sub>A</sub></b>	0.0038	0.0021	1.79
<b>E023<sub>B</sub></b>	0.0073	0.0041	1.79	<b>E063<sub>B</sub></b>	0.0021	0.0012	1.7
<b>E024<sub>A</sub></b>	0.0039	0.0022	1.76	<b>E064<sub>A</sub></b>	0.0163	0.0087	1.88
<b>E024<sub>B</sub></b>	0.0028	0.0016	1.73	<b>E064<sub>B</sub></b>	0.0274	0.0153	1.79
<b>E025<sub>A</sub></b>	0.0027	0.0015	1.82	<b>E065<sub>A</sub></b>	0.0242	0.0122	1.99
<b>E025<sub>B</sub></b>	0.0031	0.0016	1.91	<b>E065<sub>B</sub></b>	0.0012	0.0006	1.92
<b>E026<sub>A</sub></b>	0.0258	0.015	1.72	<b>E066<sub>A</sub></b>	0.0010	0.0005	1.79
<b>E026<sub>B</sub></b>	0.0006	0.00034	1.82	<b>E066<sub>B</sub></b>	0.0019	0.0009	2
<b>E027<sub>A</sub></b>	0.0146	0.008	1.83	<b>E067<sub>A</sub></b>	0.0205	0.0109	1.87
<b>E027<sub>B</sub></b>	0.0128	0.0075	1.7	<b>E067<sub>B</sub></b>	0.0157	0.0088	1.78
<b>E028<sub>A</sub></b>	0.0006	0.00034	1.85	<b>E068<sub>A</sub></b>	0.0170	0.0087	1.96
<b>E028<sub>B</sub></b>	0.0005	0.00027	1.97	<b>E068<sub>B</sub></b>	0.0121	0.0071	1.71
<b>E029<sub>A</sub></b>	0.0037	0.0021	1.77	<b>E069<sub>A</sub></b>	0.0112	0.0063	1.77
<b>E029<sub>B</sub></b>	0.0042	0.00225	1.87	<b>E069<sub>B</sub></b>	0.0474	0.0265	1.79
<b>E030<sub>A</sub></b>	0.0002	0.0001	1.89	<b>E070<sub>A</sub></b>	0.0167	0.0086	1.94
<b>E030<sub>B</sub></b>	0.0002	0.00012	1.87	<b>E070<sub>B</sub></b>	0.0005	0.0003	1.78

<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>	<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>
<b>E031<sub>A</sub></b>	0.0064	0.0037	1.72	<b>E071<sub>A</sub></b>	0.0009	0.0005	1.8
<b>E031<sub>B</sub></b>	0.0066	0.0038	1.74	<b>E071<sub>B</sub></b>	0.0002	0.0001	1.71
<b>E032<sub>A</sub></b>	0.0002	0.00012	1.8	<b>E072<sub>A</sub></b>	0.0155	0.0082	1.89
<b>E032<sub>B</sub></b>	0.0028	0.0015	1.88	<b>E072<sub>B</sub></b>	0.0135	0.0069	1.96
<b>E033<sub>A</sub></b>	0.0071	0.00395	1.79	<b>E073<sub>A</sub></b>	0.0154	0.008	1.92
<b>E033<sub>B</sub></b>	0.0077	0.004	1.92	<b>E073<sub>B</sub></b>	0.0089	0.0048	1.86
<b>E034<sub>A</sub></b>	0.0047	0.00241	1.97	<b>E074<sub>A</sub></b>	0.0880	0.05	1.76
<b>E034<sub>B</sub></b>	0.0033	0.0019	1.74	<b>E074<sub>B</sub></b>	0.0009	0.00047	1.88
<b>E035<sub>A</sub></b>	0.0068	0.00365	1.85	<b>E075<sub>A</sub></b>	0.0008	0.00039	1.95
<b>E035<sub>B</sub></b>	0.0062	0.0033	1.87	<b>E075<sub>B</sub></b>	0.0092	0.0046	2
<b>E036<sub>A</sub></b>	0.0003	0.00019	1.84	<b>E076<sub>A</sub></b>	0.0172	0.0098	1.76
<b>E036<sub>B</sub></b>	0.0036	0.002	1.79	<b>E076<sub>B</sub></b>	0.0007	0.0004	1.85
<b>E037<sub>A</sub></b>	0.0012	0.0007	1.7	<b>E077<sub>A</sub></b>	0.0006	0.00034	1.91
<b>E037<sub>B</sub></b>	0.0122	0.0065	1.87	<b>E077<sub>B</sub></b>	0.1668	0.086	1.94
<b>E038<sub>A</sub></b>	0.0067	0.00339	1.97	<b>E078<sub>A</sub></b>	0.1309	0.077	1.7
<b>E038<sub>B</sub></b>	0.0050	0.00258	1.95	<b>E078<sub>B</sub></b>	0.0093	0.0047	1.97
<b>E039<sub>A</sub></b>	0.0028	0.00148	1.9	<b>E079<sub>A</sub></b>	0.0007	0.00035	1.87
<b>E039<sub>B</sub></b>	0.0039	0.002	1.95	<b>E079<sub>B</sub></b>	0.0016	0.00096	1.7
<b>E040<sub>A</sub></b>	0.0009	0.0005	1.85	<b>E080<sub>A</sub></b>	0.0015	0.0008	1.91
<b>E040<sub>B</sub></b>	0.0064	0.0037	1.72	<b>E080<sub>B</sub></b>	0.0009	0.0005	1.8

ANEXO 10. VALORACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN GENÓMICO DE  
VOLUNTARIOS CONTROL

Código	$\lambda$ 260nm	$\lambda$ 280nm	260/280nm	Código	$\lambda$ 260nm	$\lambda$ 280nm	260/280nm
C001 <sub>A</sub>	0.0046	0.0027	1.71	C041 <sub>A</sub>	0.0054	0.003	1.79
C001 <sub>B</sub>	0.0071	0.00395	1.8	C041 <sub>B</sub>	0.0019	0.001	1.9
C002 <sub>A</sub>	0.0005	0.00027	1.75	C042 <sub>A</sub>	0.0077	0.0041	1.88
C002 <sub>B</sub>	0.0047	0.0025	1.89	C042 <sub>B</sub>	0.0071	0.004	1.77
C003 <sub>A</sub>	0.0032	0.0017	1.89	C043 <sub>A</sub>	0.0047	0.00241	1.97
C003 <sub>B</sub>	0.0165	0.0088	1.87	C043 <sub>B</sub>	0.0116	0.0064	1.82
C004 <sub>A</sub>	0.0069	0.00365	1.89	C044 <sub>A</sub>	0.0095	0.0053	1.79
C004 <sub>B</sub>	0.0131	0.0073	1.79	C044 <sub>B</sub>	0.0093	0.0048	1.94
C005 <sub>A</sub>	0.0035	0.002	1.74	C045 <sub>A</sub>	0.0033	0.0017	1.92
C005 <sub>B</sub>	0.0034	0.0017	1.98	C045 <sub>B</sub>	0.0138	0.0071	1.95
C006 <sub>A</sub>	0.0140	0.0073	1.92	C046 <sub>A</sub>	0.0123	0.0067	1.83
C006 <sub>B</sub>	0.0034	0.002	1.7	C046 <sub>B</sub>	0.0122	0.0065	1.88
C007 <sub>A</sub>	0.0036	0.002	1.8	C047 <sub>A</sub>	0.0045	0.00258	1.76
C007 <sub>B</sub>	0.0032	0.0017	1.91	C047 <sub>B</sub>	0.0032	0.0016	2
C008 <sub>A</sub>	0.0431	0.0233	1.85	C048 <sub>A</sub>	0.0034	0.0020	1.72
C008 <sub>B</sub>	0.0042	0.0021	1.98	C048 <sub>B</sub>	0.0003	0.00019	1.82
C009 <sub>A</sub>	0.0014	0.0008	1.81	C049 <sub>A</sub>	0.0006	0.00034	1.85
C009 <sub>B</sub>	0.0073	0.0037	1.97	C049 <sub>B</sub>	0.0057	0.0030	1.89
C010 <sub>A</sub>	0.0037	0.0022	1.7	C050 <sub>A</sub>	0.0053	0.003	1.75
C010 <sub>B</sub>	0.0019	0.001	1.89	C050 <sub>B</sub>	0.0108	0.0061	1.77
C011 <sub>A</sub>	0.0039	0.002	1.94	C051 <sub>A</sub>	0.0034	0.0019	1.79
C011 <sub>B</sub>	0.0010	0.0005	1.92	C051 <sub>B</sub>	0.0048	0.0025	1.93
C012 <sub>A</sub>	0.0041	0.00241	1.71	C052 <sub>A</sub>	0.0007	0.0004	1.87
C012 <sub>B</sub>	0.0037	0.002	1.85	C052 <sub>B</sub>	0.0135	0.0074	1.83
C013 <sub>A</sub>	0.0031	0.0016	1.93	C053 <sub>A</sub>	0.0033	0.0018	1.82
C013 <sub>B</sub>	0.0006	0.0003	1.86	C053 <sub>B</sub>	0.0098	0.0053	1.84
C014 <sub>A</sub>	0.0078	0.0041	1.91	C054 <sub>A</sub>	0.0048	0.0028	1.73
C014 <sub>B</sub>	0.0018	0.001	1.83	C054 <sub>B</sub>	0.0075	0.0041	1.83
C015 <sub>A</sub>	0.0107	0.0055	1.95	C055 <sub>A</sub>	0.0040	0.002	1.98

Código	$\lambda$ 260nm	$\lambda$ 280nm	260/280nm	Código	$\lambda$ 260nm	$\lambda$ 280nm	260/280nm
C015 <sub>B</sub>	0.0060	0.0033	1.82	C055 <sub>B</sub>	0.0041	0.0021	1.95
C016 <sub>A</sub>	0.0080	0.0044	1.81	C056 <sub>A</sub>	0.0072	0.0041	1.75
C016 <sub>B</sub>	0.0002	0.00012	1.81	C056 <sub>B</sub>	0.0034	0.0017	1.99
C017 <sub>A</sub>	0.0105	0.006	1.75	C057 <sub>A</sub>	0.0034	0.0017	1.98
C017 <sub>B</sub>	0.0132	0.0073	1.81	C057 <sub>B</sub>	0.0002	0.0001	1.9
C018 <sub>A</sub>	0.0107	0.0056	1.91	C058 <sub>A</sub>	0.0051	0.0026	1.97
C018 <sub>B</sub>	0.0096	0.0049	1.95	C058 <sub>B</sub>	0.0067	0.0038	1.77
C019 <sub>A</sub>	0.0098	0.0051	1.92	C059 <sub>A</sub>	0.0154	0.0077	2
C019 <sub>B</sub>	0.0030	0.0015	1.98	C059 <sub>B</sub>	0.0033	0.0018	1.82
C020 <sub>A</sub>	0.0111	0.0058	1.92	C060 <sub>A</sub>	0.0115	0.0060	1.92
C020 <sub>B</sub>	0.0035	0.002	1.73	C060 <sub>B</sub>	0.0125	0.00650	1.93
C021 <sub>A</sub>	0.0127	0.0069	1.84	C061 <sub>A</sub>	0.0065	0.00350	1.87
C021 <sub>B</sub>	0.0036	0.0018	1.98	C061 <sub>B</sub>	0.0150	0.0075	2
C022 <sub>A</sub>	0.0112	0.0065	1.72	C062 <sub>A</sub>	0.0058	0.0032	1.8
C022 <sub>B</sub>	0.0048	0.0025	1.92	C062 <sub>B</sub>	0.0140	0.007	2
C023 <sub>A</sub>	0.0045	0.0026	1.73	C063 <sub>A</sub>	0.0083	0.0043	1.92
C023 <sub>B</sub>	0.0065	0.0033	1.96	C063 <sub>B</sub>	0.0091	0.0050	1.82
C024 <sub>A</sub>	0.0011	0.0006	1.9	C064 <sub>A</sub>	0.0149	0.0080	1.86
C024 <sub>B</sub>	0.0089	0.0046	1.93	C064 <sub>B</sub>	0.0089	0.0047	1.9
C025 <sub>A</sub>	0.0106	0.0057	1.86	C065 <sub>A</sub>	0.0195	0.0112	1.74
C025 <sub>B</sub>	0.0126	0.0072	1.75	C065 <sub>B</sub>	0.1634	0.0860	1.9
C026 <sub>A</sub>	0.0099	0.0057	1.73	C066 <sub>A</sub>	0.0304	0.0165	1.85
C026 <sub>B</sub>	0.0144	0.0073	1.97	C066 <sub>B</sub>	0.0440	0.0235	1.87
C027 <sub>A</sub>	0.0095	0.0052	1.83	C067 <sub>A</sub>	0.0108	0.0060	1.8
C027 <sub>B</sub>	0.0026	0.0014	1.84	C067 <sub>B</sub>	0.0042	0.0023	1.81
C028 <sub>A</sub>	0.0092	0.0047	1.96	C068 <sub>A</sub>	0.0109	0.0057	1.92
C028 <sub>B</sub>	0.0065	0.0036	1.8	C068 <sub>B</sub>	0.0023	0.0013	1.76
C029 <sub>A</sub>	0.0034	0.0018	1.91	C069 <sub>A</sub>	0.0156	0.0078	2
C029 <sub>B</sub>	0.0075	0.0041	1.83	C069 <sub>B</sub>	0.0103	0.0057	1.81
C030 <sub>A</sub>	0.0120	0.006	2	C070 <sub>A</sub>	0.0008	0.0004	1.95
C030 <sub>B</sub>	0.0013	0.0007	1.8	C070 <sub>B</sub>	0.0125	0.0063	1.99

<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>	<b>Código</b>	<b><math>\lambda</math> 260nm</b>	<b><math>\lambda</math> 280nm</b>	<b>260/280nm</b>
<b>C031<sub>A</sub></b>	0.0047	0.0026	1.8	<b>C071<sub>A</sub></b>	0.0257	0.01358	1.89
<b>C031<sub>B</sub></b>	0.0140	0.0071	1.97	<b>C071<sub>B</sub></b>	0.0203	0.01092	1.86
<b>C032<sub>A</sub></b>	0.0097	0.0049	1.97	<b>C072<sub>A</sub></b>	0.0106	0.0059	1.8
<b>C032<sub>B</sub></b>	0.0122	0.0065	1.88	<b>C072<sub>B</sub></b>	0.0035	0.0018	1.93
<b>C033<sub>A</sub></b>	0.0113	0.0064	1.77	<b>C073<sub>A</sub></b>	0.0076	0.004	1.89
<b>C033<sub>B</sub></b>	0.0072	0.0037	1.95	<b>C073<sub>B</sub></b>	0.0074	0.004	1.86
<b>C034<sub>A</sub></b>	0.0040	0.0023	1.76	<b>C074<sub>A</sub></b>	0.0088	0.0048	1.83
<b>C034<sub>B</sub></b>	0.0101	0.0055	1.84	<b>C074<sub>B</sub></b>	0.0114	0.0063	1.81
<b>C035<sub>A</sub></b>	0.0054	0.003	1.81	<b>C075<sub>A</sub></b>	0.0121	0.0061	1.99
<b>C035<sub>B</sub></b>	0.0011	0.0006	1.82	<b>C075<sub>B</sub></b>	0.0039	0.0023	1.7
<b>C036<sub>A</sub></b>	0.0058	0.0033	1.75	<b>C076<sub>A</sub></b>	0.0138	0.0076	1.82
<b>C036<sub>B</sub></b>	0.0078	0.004	1.96	<b>C076<sub>B</sub></b>	0.0023	0.0012	1.91
<b>C037<sub>A</sub></b>	0.0054	0.003	1.8	<b>C077<sub>A</sub></b>	0.0034	0.0019	1.79
<b>C037<sub>B</sub></b>	0.0005	0.0003	1.7	<b>C077<sub>B</sub></b>	0.0064	0.0032	2
<b>C038<sub>A</sub></b>	0.0112	0.0065	1.72	<b>C078<sub>A</sub></b>	0.0083	0.0046	1.81
<b>C038<sub>B</sub></b>	0.0056	0.0032	1.76	<b>C078<sub>B</sub></b>	0.0071	0.0039	1.82
<b>C039<sub>A</sub></b>	0.0103	0.0054	1.91	<b>C079<sub>A</sub></b>	0.0114	0.0067	1.7
<b>C039<sub>B</sub></b>	0.0026	0.0015	1.72	<b>C079<sub>B</sub></b>	0.0026	0.0013	1.98
<b>C040<sub>A</sub></b>	0.0113	0.0059	1.92	<b>C080<sub>A</sub></b>	0.0179	0.009861	1.82
<b>C040<sub>B</sub></b>	0.0113	0.0061	1.86	<b>C080<sub>B</sub></b>	0.0005	0.0003	1.76