



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ
GALLO**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGIA**



TESIS

Determinación de la frecuencia de los polimorfismos de un solo nucleótido, rs1799853 y rs1057910 del gen *CYP2C9* en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo 2023-2024.

**Presentada para optar el Título Profesional de
Licenciado(a) en Ciencias Biológicas - Biología**

Autor(es):

Br. Puestas Sánchez Christian Mateo

Br. Velásquez Bances Jadira Jahayra

Asesor:

Dr. Cachay Wester Jorge Victor Wilfredo

Lambayeque, Perú

05 de noviembre del 2025



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ
GALLO**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
BIOLOGIA**



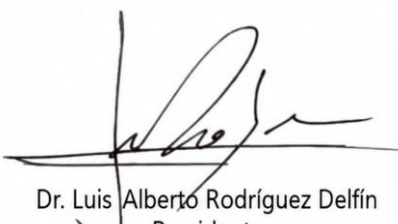
Determinación de la frecuencia de los polimorfismos de un solo nucleótido, rs1799853 y rs1057910 del gen *CYP2C9* en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo 2023- 2024.

Presentado por:


Br. Puestas Sánchez Christian Mateo


Br. Velásquez Bancas Jadira Jahayra

Aprobado por:


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfin
Presidente


Mg. Jhon Wiston García López
Secretario


Dr. Marco Antonio Guzmán Tello
Vocal


Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester
Asesor

Determinación de la frecuencia de los polimorfismos de un solo nucleótido, rs1799853 y rs1057910 del gen CYP2C9 en estudiantes de la Facultad De Ciencias Biológicas De La Universidad Nacional Pedro Ru

INFORME DE ORIGINALIDAD

12% INDICE DE SIMILITUD	12% FUENTES DE INTERNET	5% PUBLICACIONES	2% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE
-----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------	--------------------------------------

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	revistabiomedica.org Fuente de Internet	1%
4	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1%
5	repositorio.unprg.edu.pe:8080 Fuente de Internet	<1%
6	dehesa.unex.es Fuente de Internet	<1%
7	dehesa.unex.es:8080 Fuente de Internet	<1%
8	zagan.unizar.es Fuente de Internet	<1%

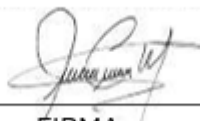


FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester
DNI:46434263
ASESOR

9	Ma. Nieves Trujillo Tapia, María Eugenia Hidalgo Lara, Ramón Alberto Batista García, Rosa María Camacho Ruiz. "Manual de métodos para el estudio de extremófilos", Universidad Autonoma del Estado de Morelos, 2023 Publicación	<1 %
10	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
11	pmc.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1 %
12	pure.urosario.edu.co Fuente de Internet	<1 %
13	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	ww1.msc.es Fuente de Internet	<1 %
16	Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	<1 %
17	Submitted to espam Trabajo del estudiante	<1 %

repositorio.ucp.edu.pe



FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester
DNI:46434263
ASESOR

18	Fuente de Internet	<1 %
19	www.jove.com Fuente de Internet	<1 %
20	files01.core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
21	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
22	www.fabriciogonzalezandrade.com Fuente de Internet	<1 %
23	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1 %
24	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
25	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
26	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
27	Submitted to Universidad Anahuac México Sur Trabajo del estudiante	<1 %
28	digital.csic.es Fuente de Internet	<1 %
29	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %



FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester
DNI:46434263
ASESOR

		<1 %
30	repositorio.ucam.edu Fuente de Internet	<1 %
31	Submitted to Universidad del Valle de Guatemala Trabajo del estudiante	<1 %
32	livrosdeamor.com.br Fuente de Internet	<1 %
33	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
34	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
35	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
36	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
37	Submitted to uady Trabajo del estudiante	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 14 words

Excluir bibliografía

Activo



FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester

DNI:46434263

ASESOR



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Puescas Sánchez Christian Mateo Y Velasquez Bances Jadira Ja...
Título del ejercicio: Quick Submit
Título de la entrega: Determinación de la frecuencia de los polimorfismos de un sol...
Nombre del archivo: S_Puecas_S_nchez_Christian_M_y_Velasquez_Bances_Jahayra...
Tamaño del archivo: 1.49M
Total páginas: 68
Total de palabras: 12,655
Total de caracteres: 70,668
Fecha de entrega: 14-may-2026 10:49a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2961193475



Derechos de autor 2026 Turnitin. Todos los derechos reservados.

FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester

DNI:46434263

ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 072-2025 / FCCBB-UI

Siendo las 09:00 horas del día 05 de noviembre de 2025, en la Sala de Lectura - de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, se reunieron los miembros del Jurado designado mediante **Resolución N° 319-2023-VIRTUAL-FCCBB/D de fecha 06 de diciembre de 2023 y Resolución N° 117-2024-FCCBB/D de fecha 02 de abril de 2024, se aprueba el Proyecto de Tesis**, conformado por:

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín-Presidente

Mg. Jhon Wiston García López-Secretario

Dr. Marco Antonio Guzmán Tello-Vocal


Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester-Asesor

con la finalidad de evaluar la sustentación de tesis titulada: **Determinación de la Frecuencia de los Polimorfismos de un Solo Nucleótido, rs1799853 y rs1057910 del gen CYP2C9 en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo 2023-2024**, de los Bachilleres CHRISTIAN MATEO PUESCAS SÁNCHEZ Y JADIRA JAHAYRA VELASQUEZ BANCES.


Sustentación autorizada por **RESOLUCIÓN N° 505-2025-FCCBB-D de fecha 22 de octubre de 2025** la misma que tuvo una duración de 30 minutos y luego de absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, obteniendo 20 puntos que equivale al calificativo de EXCELENTE.


Por lo que Los sustentantes quedan **APTOS** para obtener el título profesional de **Licenciado (a) en Ciencias Biológicas – Biología** de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 10:05 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.


Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Presidente


Mg. Jhon Wiston García López
Secretario


Dr. Marco Antonio Guzmán Tello
Vocal


Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester
Asesor

CONSTANCIA DE VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester; usuario revisor del informe de tesis titulado: Determinación de la Frecuencia de los Polimorfismos de un Solo Nucleótido, rs1799853 y rs1057910 del gen *CYP2C9* en Estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo 2023-2024.

Cuyos autores son, Bach. Christian Mateo Puescas Sánchez con DNI: 72228775 y Bach. Jadira Jahayra Velasquez Bances con DNI 75482289; declaro que la evaluación realizada por el Programa informático ha arrojado un porcentaje de similitud de 12 %, verificable en el Resumen de Reporte automatizado de similitudes que se acompaña.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas dentro del porcentaje de similitud permitido no constituyen plagio y que el documento cumple con la integridad científica y con las normas para el uso de citas y referencias establecida en los protocolos respectivos.

Se cumple con adjuntar el Recibo Digital a efectos de la trazabilidad respectiva del proceso.

Lambayeque, 27 de Setiembre del 2025



FIRMA

Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester

DNI:46434263

ASESOR

DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuente de sabiduría, fortaleza y bendiciones en mi vida.

A mis padres, Pablo y Flor María; por su amor incondicional, sacrificio y apoyo constante, los cuales fueron el pilar fundamental en mi vida, guiándome hacia la culminación de esta etapa.

A mis hermanos; Pablo, Martha y Flor; por su complicidad, su apoyo incondicional, que con sus palabras de aliento, han sido un impulso vital en esta etapa.

A mis sobrinas, que llenan mis días con risas y alegrías, recordándome que nunca hay que perder la capacidad de asombrarse ante el mundo que nos rodea.

A todas las personas, compañeros y amistades que fueron parte de mi desarrollo profesional.

Christian Mateo Puescas Sánchez

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios por brindarme sabiduría y la fortaleza necesaria para poder culminar esta meta.

A mi madre, Erika Bances Florian, por su amor inquebrantable, su apoyo incondicional, por ser mi ejemplo de superación. Gracias mamá, por ser mi roca y por celebrar mis triunfos tanto como por sostenerme en mis caídas.

A mis abuelitos, Rosendo y Dioselina, por sus consejos llenos de sabiduría y por enseñarme el valor de la humildad y la perseverancia.

A mis sobrinos por alegrar mis días.

A mi gran amiga Maricielo por brindarme sus palabras de aliento, por las buenas pláticas y por el cariño brindado.

Por último, pero no menos importante, a mi compañera fiel, mi mascota Dasha, por su compañía incondicional y por ser una fuente constante de alegría y consuelo en los momentos de estrés y soledad.

Jadira Jahayra Velasquez Bances

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, por su gracia y bendiciones, por darnos fortaleza y perseverancia; que con su luz nos guió en este proceso para la obtención del título profesional

A nuestros padres, por su amor incondicional, apoyo inquebrantable y ser una constante fuente de inspiración, su sacrificio es el pilar en el cual se construye este logro

A nuestro asesor Dr. Jorge Victor Wilfredo Cachay Wester, por su orientación experta, paciencia y compromiso con nuestro desarrollo profesional, sus conocimientos y apoyo han sido fundamentales para convertir este proyecto en realidad.

Al Dr. Luis Rodríguez, por su apoyo constante y valiosa orientación en el laboratorio, lo cual fue fundamental para el desarrollo de la presente investigación.

INDICE GENERAL

CONSTANCIA DE VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD.....	iii
DEDICATORIA	x
DEDICATORIA	xi
AGRADECIMIENTOS.....	xii
INDICE DE TABLAS.....	xv
INDICE DE FIGURAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. DISEÑO TEORICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas.....	9
1.2.1. Generalidades del Citocromo CYP450 2C9 (<i>CYP2C9</i>).....	9
1.2.2. Genotipo y fenotipo	10
1.2.4. Definición de términos básicos.....	12
CAPITULO II. DISEÑO METODOLÓGICO	13
2.1. Tipo de investigación y diseño de investigación	13
2.2. Población, muestra y criterio de selección.....	13
2.2.1. Población	13
2.2.2. Muestra	13
2.2.3. Criterios de selección.....	14
2.3. Métodos, técnicas, instrumentos y procedimiento de recolección de datos.....	14
2.3.1. Metodología.....	14

2.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR convencional.	17
2.3.3. Electroforesis	19
2.3.4. Polimorfismo de conformación de Cadena simple (SSCP)	19
2.3.5. Secuenciación de Sanger.	21
2.3.6. Aspectos éticos	21
CAPITULO III. RESULTADOS.....	22
3.1. Amplificación de las regiones genómicas que contienen a los SNP's rs1799853 (*2) y rs1057910 (*3).....	22
3.2. Estimación de las frecuencias genotípicas.....	25
3.3. Equilibrio De Hardy-Weiberg	27
3.3.1. Alelo mutado *2 (SNP rs1799853).....	27
3.3.2. Alelo mutado *3 (SNP rs1057910).....	28
3.3. Comparación de los perfiles de SSCP con la Secuenciación de las regiones genómicas que contienen a los alelos mutados *2 y *3 (rs1799853 y rs1057910).....	30
3.4 . Comparación poblacional de las secuencias genómicas obtenidas de los estudiantes de la FCCBB-UNPRG.....	36
IV. DISCUSION.....	40
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES	44
VII. REFERENCIAS	45
VIII. ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los alelos *1, *2, *3	10
Tabla 2. Secuencias de cebadores diseñados para la detección de los alelos mutados 2* y *3 .	17
Tabla 3. Condiciones de la PCR para amplificar los alelos mutados *2 y *3.....	18
Tabla 4. Condiciones térmicas de la PCR para amplificar los alelos mutados *2 y *3	18
Tabla 5. Composición del gel SSCP (Poliacrilamida al 6%).....	20
Tabla 6. Condiciones para la desnaturalización de los productos amplificados	20
Tabla 7. Edición del programa para la desnaturalización de los productos amplificados	20
Tabla 8. Frecuencias génicas y genotípicas para los alelos mutados *2 y *3.....	29
Tabla 9. Prueba de Chi-cuadrado para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg del alelo mutado *3.....	30
Tabla 10. Electroferogramas de las muestras 2,3 y 64 del Patrón A del alelo mutado *2 (SNP rs1799853) y Alelo 8 (rs79001894).....	32
Tabla 11. Electroferogramas de las muestras 1,8 del patrón A del Alelo mutado *3 (SNP rs1057910) del Gen CYP2C9).....	323
Tabla 12. Electroferogramas de las muestras 4,10 y 70 del patrón B del Alelo mutado *3 (SNP rs1057910) del Gen CYP2C9.....	324
Tabla 13. Electroferogramas de las muestras 32 y 33 del patrón C del Alelo mutado *3 (SNP rs1057910) del Gen CYP2C9.....	325
Tabla 14. Comparación poblacional de los tipos de fenotipos metabolizadores de acuerdo a su distribución genómica.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de trabajo utilizado para el procesamiento de muestras sanguíneas de los Estudiantes de la FCCBB.....	15
Figura 2. Identificación y validación de los cebadores del SNP rs1799853 C/T (Alelo mutado *2) del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowser	23
Figura 3. Identificación y validación del SNP rs1057910 (Alelo mutado *3) A/C/G del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowse	24
Figura 4. Visualización, validación y estandarización mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa de los primers diseñados para los alelos mutados *2 y *3.....	25
Figura 5. Visualización del producto de PCR–SSCP en gel de poliacrilamida para el alelo mutado *2	26
Figura 6. Visualización del producto de PCR–SSCP en gel de poliacrilamida para el SNP rs1057910(*3). (A) Patrón A y B. (B) Patrón C.	26
Figura 7. Alineamiento de Secuencias de las muestras 2,3 y 64 del alelo mutado *2 (rs1799853) C/T del Gen CYP2C9	37
Figura 8. Alineamiento de Secuencias de las muestras 1, 8, 4,10, 70, 32 y 33, del alelo mutado *3 (rs1057910) A/C/G del Gen CYP2C9.....	38
Figura 9. Visualización del producto de PCR en gel de agarosa al 1%.....	55
Figura 10. Análisis del SNP rs79001894 G/A/C/T Alelo *8 del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowser	56
Figura 11. Alineamiento de Secuencias de las muestras 2,3 y 64 del patrón A del SNP rs79001894 G/A/C/T Alelo *8 del Gen CYP2C9 en el software MEGA.....	57

RESUMEN

El gen CYP2C9 codifica una enzima del citocromo P450 implicada en el metabolismo de aproximadamente el 20 % de los fármacos clínicos. Las variantes alélicas CYP2C9*2 (rs1799853) y CYP2C9*3 (rs1057910) afectan significativamente la actividad enzimática y, por ende, la respuesta farmacológica individual. Este estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia de estos polimorfismos en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (2023–2024), mediante PCR-SSCP. Se analizaron 70 muestras. Para rs1799853, todas presentaron el genotipo homocigoto CC, evidenciando ausencia de variabilidad genética y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. En rs1057910 se observó mayor diversidad genotípica (AA: 75.7 %, AC/AG: 21.4 %, CC/GG: 2.9 %) y se encontró en equilibrio poblacional.

Estos resultados resaltan la importancia de estudios farmacogenéticos regionales para optimizar la prescripción de medicamentos según el perfil genético individual, y constituyen un punto de partida para futuras investigaciones orientadas a implementar estrategias de medicina personalizada en la región de Lambayeque.

PALABRAS CLAVE: Alelos, Genotipo, farmacogenética.

ABSTRACT

The CYP2C9 gene encodes a cytochrome P450 enzyme involved in the metabolism of approximately 20% of clinically used drugs. The allelic variants CYP2C9*2 (rs1799853) and CYP2C9*3 (rs1057910) significantly affect enzymatic activity and, consequently, individual drug response. This study aimed to determine the frequency of these polymorphisms in students from the Faculty of Biological Sciences at the National University Pedro Ruiz Gallo (2023–2024), using the PCR-SSCP technique. A total of 70 samples were analyzed. For rs1799853, all samples exhibited the homozygous CC genotype, indicating an absence of genetic variability and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. In contrast, rs1057910 showed greater genotypic diversity (AA: 75.7%, AC/AG: 21.4%, CC/GG: 2.9%) and was found to be in population equilibrium.

These findings highlight the importance of conducting regional pharmacogenetic studies to optimize drug prescription based on individual genetic profiles and represent a starting point for future research aimed at implementing personalized medicine strategies in the Lambayeque region.

KEYWORDS: Alleles, Genotype, Pharmacogenetics.

INTRODUCCIÓN

CYP2C9, miembro 9 de la subfamilia C de la familia 2 del citocromo P450, presenta 9 exones (National Center for Biotechnology Information, 2020) y desempeña un papel fundamental en el metabolismo de aproximadamente el 20 % de los fármacos utilizados clínicamente y se han descrito hasta el momento 85 variantes alélicas, de las cuales las principales variantes de importancia clínica a las cuales nos referiremos como **alelos mutados** son **2: alelo mutado *2 ó CYP2C9*2** o SNP rs1799853 y **alelo mutado *3 ó CYP2C9*3** Ó SNP rs1057910, y el **alelo*1 ó CYP2C9*1**, el cual es el alelo normal o silvestre. Se encuentra ubicado en el cromosoma 10q23.33 y abarca alrededor de 390 kb, así mismo este locus contiene también a *CYP2C8*, *CYP218* Y *CYP219* (Pratt et al., 2019). Esta proteína, está compuesta por 490 aminoácidos y con un peso molecular estimado de 55 kDa (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12111419/>)

Los polimorfismos genéticos del gen *CYP2C9*, son considerados un factor determinante en la variabilidad en la respuesta de medicamentos en cada individuo. Por lo tanto, la variabilidad interindividual y diversidad poblacional en la expresión de los genes que contienen a estos polimorfismos, pueden afectar la respuesta a tratamientos farmacológicos (Daly et al., 2017).

Estudios poblacionales han descrito frecuencias heterogéneas de las variantes alélicas de *CYP2C9* alrededor del mundo, principalmente en Europa, África y Asia (Yoon et al., 2021, p. 277). **Los alelos mutados *2 y *3** son los polimorfismos con frecuencias más altas, siendo estos causantes de la reducción de la actividad enzimática en un 50-70% y 75-99% respectivamente, una disminución de función indica exposición y dosis más altas de fármacos aumentando el riesgo de hemorragias gastrointestinales (Zhou et al., 2023).

Latinoamérica presenta una amplia heterogeneidad de ascendencias; Brasil y Colombia presentan la mayor proporción de ascendencia africana y europea (Ramírez et al., 2019),

mientras que, en Perú, estudios genéticos han evidenciado la diversidad de su población, siendo en su mayoría amerindios, europeos, y en menor proporción africanos y asiáticos (Alvarado et al., 2019).

Alvarado et al (2019) expresan su inquietud en una de sus investigaciones publicadas recientemente años atrás, acerca de la insuficiente investigación que se ha hecho en torno a *CYP2C9* en Perú, dado que este gen tiene relevancia médica y desempeña un importante papel en la eficacia de los tratamientos dados a cada individuo. En este contexto, en el presente estudio se propuso determinar la frecuencia de los alelos mutados *2 y *3, en un grupo de estudiantes Lambayecanos, con la finalidad de elaborar un marco de referencia en relación la distribución de los polimorfismos de este gen en estudiantes de la región Lambayeque y pueda servir como base de datos para futuras investigaciones en el área de farmacogenómica y contribuir con el conocimiento sobre el metabolismo de fármacos en poblaciones adultas.

Por lo tanto, se formuló la siguiente interrogante, ¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos rs1799853 y rs1057910 del gen *CYP2C9* en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo 2023- 2024?. Para lo cual se planteó como objetivo principal de este estudio, analizar los SNP rs1799853 (*CYP2C9**2) y rs1057910 (*CYP2C9**3) en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo 2023- 2024, utilizando abordajes de biología molecular y genética de poblaciones. Los objetivos específicos del estudio fueron, detectar las regiones que contienen a los alelos mutados *2 y *3 en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo mediante PCR de alelo específico; también estimar el equilibrio de Hardy-Weinberg de los alelos mutados *2 y *3 para conocer la variante alélica más frecuente en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y comparar los genotipos obtenidos de los estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

CAPITULO I. DISEÑO TEORICO

1.1. Antecedentes

Stubbins et al (1996) describen los primeros ensayos que se basaron en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de distinguir secuencias alélicas del gen *CYP2C9* y sus frecuencias en la población caucásica, que son generadas debido a la sustitución de una base en la región codificante del gen. En ese año, había estudios de 6 secuencias de ADN de *CYP2C9* humano diferente, además, que a la secuencia *CYP2C10* se le consideraba altamente homóloga. Del total de 7 secuencias estudiadas la más común fue *CYP2C9**1.

Zhou et al. (2023) realizan una revisión de 108 artículos originales que incluían datos de 81 662 individuos no relacionados en 70 países y 40 grupos étnicos únicos, en donde se obtuvo que en Europa y Oriente Medio el alelo mutado *2 fue el más abundante, teniendo una significativa prevalencia en Irán (18,1 %), Croacia (16,5 %), Líbano (15,4 %) y Francia (15 %). Para la población del este y sur de Asia fue casi ausente (<5%). En la población del norte de África se obtuvo un 12 %. Mientras que, en la población de las Américas, se observaron frecuencias altas en Brasil (10,7 %), y bajas en Ecuador (0,5 %), México (3,7 %) y Perú (3,8 %). Las frecuencias más altas para el alelo mutado*3, se obtuvo en la población de Europa y Medio Oriente, presentando en España (10,1 %) y Turquía (9,8 %), siendo ausente o era raro en África subsahariana y Asia oriental. También se encontró gran presencia en la población Emiratos Árabes Unidos (21,3 %), siendo un porcentaje alto en comparación de otras poblaciones de Medio Oriente (<6 %). Se obtuvo también que en población del sur de Asia está presente en frecuencias altas como 11,9 % en Pakistán y 11,6 % en Bangladesh. Para Suramérica, se obtuvo frecuencias altas en Uruguay (7,6 %), Colombia (6,8 %) y Brasil (6 %), pero inferiores al 5 % en todos los demás países informados.

Naujokaitis et al. (2021) realizaron un estudio retrospectivo con la base de datos de la Clínica Kaunas (Lituania) de un total de 54 pacientes en el periodo 2017-2018; donde se buscó

evaluar las variaciones alélicas de las enzimas del citocromo P450 (CYP), el *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2D6*, clasificando a los pacientes como metabolizadores normales (NM), metabolizadores intermedios (IM), metabolizadores rápidos (RM), metabolizadores ultrarrápidos (UM) y metabolizadores lentos (PM). Para *CYP2C9*, se obtuvo que 44 pacientes (81,48%) tuvieron genotipo *1/*1, se clasificaron como metabolizadores normales (NM); y 10 pacientes (18,52%) con los genotipos *1/*2;*1/*3 se clasificaron como metabolizadores intermedios (MI).

Vidović et al. (2021) determinaron la prevalencia de las variantes alélicas de los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* en la población general de la República de Srpska (Bosnia y Herzegovina), en una población de 216 voluntarios sanos seleccionados al azar mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), obtuvieron que para el alelo*1 de tipo salvaje se presentó en la gran mayoría (78,90 %), seguido del alelo mutado *2 (13,66 %) y una baja prevalencia del alelo mutado *3 (7,40 %). Los genotipos más prevalentes fueron de 62,03 % para los metabolizadores normales (*1/*1). Por su lado los metabolizadores lentos (*2/*3 y *3/*3) representaron el 1,86 %, y los metabolizadores intermedios (*1/*2 , *1/*3 o *2/*2) el 36,11 % de los participantes.

Dorji et al. (2019) realizó una revisión sistemática que abarcó estudios relevantes relacionados con las frecuencias genotípicas de *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* y *CYP3A5*, este estudio se centró en polimorfismos clínicamente relevantes para las poblaciones del sudeste y este de Asia (SEEA). La revisión incluyó un total de 340 artículos los cuales incluyen estudios en 16 poblaciones: birmanos, chinos, indonesios, japoneses, minoría étnica Karen, coreanos, malasios (malayos, chinos e indios), filipinos, singapurenses (chinos, malayos e indios), taiwaneses, tailandesa y vietnamita. Entre estas poblaciones los alelos comunes eran *CYP2C9**1, *2 y *3 y el genotipo *1/*1 resultó ser el más prevalente reportándose con una frecuencia entre 69.27% y 95.54%, le siguieron los genotipos *1/*3 con un rango de 4.45% al

20.11% y *3*3 abarca del 0% al 2.23%. Los genotipos *1/*2, *2/*2 y *2/*3 también se observan en la muestra solo que en menor frecuencia.

Un estudio realizado por Ahmed et al. (2020), con el fin de identificar las variaciones en las frecuencias de polimorfismos en el gen *CYP2C9* en población pakistaní, contaron con la participación de 467 voluntarios los cuales estaban repartidos entre 6 etnias principales de Pakistán las cuales eran: punjabis, pathan, sindhi, balochi, seraiki y urdu, el genotipado se realizó mediante ARMS-PCR. En este estudio se tuvo como resultado que las frecuencias alélicas de alelo silvestre *1, alelo mutado *2 y alelo mutado*3 en las 6 etnias pakistaníes fue 0,876, 0,059 y 0,064, respectivamente, siendo mayor la frecuencia alélica para el alelo silvestre*1, mientras que las frecuencias de genotipo fue 80,3% para el genotipos*1*1 , 6,2% para el genotipo *1*2, 8,4% para el genotipo *1*3, 0,6% para el genotipo *2*2 y 4,5% para el genotipo*2*3; siendo la mayor frecuencia para el genotipo *1/*1.

Calderon et al. (2020) realizaron un estudio en 67 pacientes colombianos adultos con epilepsia, con el fin de evaluar el impacto de factores genéticos y cómo se asocian con la reacción adversa a medicamentos (RAM) de la fenitoína mediante un estudio de cohorte prospectivo, observacional y analítico para detectar cuatro polimorfismos en farmacogenes, entre los cuales se encontraba los alelos mutados *2 y *3, los polimorfismos se amplificaron mediante PCR. La frecuencia alélica más destacada corresponde al alelo silvestre *1 presentando un 86.4%, en segundo lugar, se encontró el alelo mutado *2 con un 9.1%, seguida por el alelo mutado*3 con un 4.5%. En cuanto a la frecuencia genotípica, la combinación más común fue para *1/*1 con un 74% del total de la muestra, le sigue *1/*2 con un 18.2% , *1/*3 con un 6,5% y *3/*3 con 1.3%.

En Chile (Miranda et al, 2011) se realizó un estudio a voluntarios sanos para poder detectar el alelo mutado *2 y conocer cómo actúa en la biotransformación y respuesta a

tratamientos con acenocumarol, los genotipos se detectaron mediante PCR-RFLP. Se estudió a 24 voluntarios sanos, de estos 19 eran homocigotos dominantes *CYP2C9**1/*1, 4 eran heterocigotos *CYP2C9**1/*2 y 1 voluntario era homocigoto recesivo *CYP2C9**2/*2.

En un estudio realizado por Vicente et al (2014), el cual se centraba en investigar las posibles diferencias entre españoles y mestizos ecuatorianos con respecto a *CYP2C9* y otros genes de importancia médica, obtuvieron el ADN de 282 sujetos españoles y 297 ecuatorianos, se genotipo mediante piro secuenciación a los alelos mutados *2 y *3. En ecuatorianos mestizos los alelos mutados *2 y *3 se detectaron en una frecuencia de 0.5% y 3.7% respectivamente, mientras que en españoles las variantes se encontraron en un 13,3% y 7.7%. La frecuencia del genotipo *1/*1 en españoles y ecuatorianos mestizos fueron de 58.1% y 91.6% respectivamente, para los genotipos *1/2 o *1/*3 fue de un 36.9% y 8.4% para españoles y ecuatorianos mestizos, mientras que para los genotipos *2/*2, *2/*3 ó *3/*3 con un 5% y 0% para españoles y ecuatorianos mestizos.

Cuautle et al. (2019) en su investigación nos describe el uso de sulfonilureas en 199 pacientes mexicanos con diabetes mellitus tipos II (DMT2), las cuales son metabolizadas por el citocromo P450 2C9. Esta investigación tenía como finalidad describir los alelos mutados *2, *3, *IVS8-109T* y su importancia clínica en la variabilidad de la respuesta a glibenclamida. A los pacientes se les administró diferentes tratamientos con glibenclamida (n=11), glibenclamida combinada con metformina (n = 112) o metformina (n = 76). El ADN genómico se extrajo de muestras sanguíneas, y fueron posteriormente genotipificadas utilizando una PCR cuantitativa con transcripción inversa, discriminación alélica de punto final y polimorfismo largo de fragmentos de restricción enzimáticos amplificados por PCR. En este estudio se obtuvieron como frecuencia de genotipos: 87,5% para *CYP2C9**1/*1; 6,5% para *1/*2; y 5,2% para *1/*3. Al final no se pudo demostrar la asociación entre los polimorfismos de *CYP2C9* y

el metabolismo de sulfonilureas que pretendían explicar los precarios niveles de control de DMT2.

Guevara et al., (2017) realizaron un estudio en el que analizaron los genes *CYP2C9*, *CYP2C19* y *EPHX* en 50 pacientes uruguayos diagnosticados con epilepsia, tratados con fenitoína en un rango de edades de 18-76 años. Los autores utilizaron la técnica de PCR convencional y secuenciación para conocer los SNP's de *CYP2C9*. Los resultados, del gen de nuestro interés, revelaron que de los participantes 34 (68%) pacientes eran homocigotos para el alelo de tipo salvaje (*1/*1) clasificando, así como metabolizadores normales. Por otro lado un total de 15 pacientes eran heterocigotos portando un alelo de tipo salvaje y un alelo mutante (*1/*2 o *1/*3), los que llevó a categorizarlos como metabolizadores intermedios a 11 (22%) y 4(8%) individuos respectivamente. Solamente un paciente (2%) era homocigoto recesivo (*2/*2) catalogándolo como metabolizador pobre.

Ramírez, J., (2016) realizó un estudio en 133 personas nicaragüenses, mestizas y sanas, cuyo objetivo era determinar la variabilidad interindividual de las enzimas *CYP2D6*, *CYP2C9*; *CYP2C19* y compararlas con otras poblaciones latinoamericanas. Lo que respecta a *CYP2C9* y sus variantes alélicas * 2, * 3 y * 6, se realizaron mediante PCR-RT con ensayos TaqMan. Como resultado se obtuvo que para *CYP2C9* la población mayoritariamente es metabolizadora normal para esta enzima. En frecuencia alélica obtuvieron un 88,3% para alelo silvestre *1, 9,5 para alelo mutado*2 y 2,3% para alelo mutado *3, sin embargo no se encontró el alelo *CYP2C9**6, mientras que para la frecuencia de genotipos se obtuvo un 76,5% para el genotipo *1/*1; 18,9% para el genotipo *1/*2 y 4,6% para el genotipo *1/*3. Se concluyó que la población nicaragüense presenta un patrón de distribución parecido al de la mayoría de las poblaciones mestizas de América Latina.

Alvarado et al. (2019) determinó la frecuencia de las variantes CYP2C9*2 y CYP2C9*3 en 218 peruanos mestizos provenientes de Lima, Tacna y Junín. Para la obtención del ADN genómico se realizaron hisopados de mucosa oral, y la detección de las variantes se hizo mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan. Como resultado de este estudio se determinó que las variantes *2 y *3 se encuentran en una frecuencia de 0.046 y 0.062 respectivamente, también este estudio predijo las frecuencias de los genotipos en la población mestiza peruana: CYP2C9*1/*2 con 5,96 % y CYP2C9*1/*3 con un 9,17 % correspondiendo ambos al fenotipo de metabolizadores intermedios, por otro lado los genotipos CYP2C9*2/*2 con un 1,38 %; CYP2C9*3/*3 con un 1,38 %; CYP2C9*2/*3 con un 0,46 % representan al fenotipo metabolizador lento.

En el año 2020, Rodríguez, A., llevó a cabo una investigación de los alelos mutados *2 y *3 en hipertensión arterial con el objetivo de determinar la asociación de las variantes y un grupo de pacientes peruanos hipertensos y controles normotensos residentes en Lima. En esta investigación, se trabajó con una muestra de 357 pacientes. Para llevar a cabo esta investigación el autor utilizó la técnica de PCR en tiempo real que permitió conocer la genotipificación en las variantes de interés. El alelo mutado *2 fue observada en un 3,1% de la muestra, mientras que el alelo mutado*3 se encontró en un 3,5%. Se demostró que los alelos mutados *2 y *3 no tienen relación con la hipertensión arterial.

Un estudio reciente en Perú realizado en ciento setenta y cuatro voluntarios peruanos sanos (73 mujeres y 101 hombres) de diferentes grupos étnicos, a los cuales se les separó por ecorregiones, en la Costa se tenía a los departamentos de Lambayeque, Lima e Ica, la ecorregión andina formada por Puno, Arequipa, Ancash, Cajamarca y la ecorregión amazónica conformada por Loreto y San Martín. Se obtuvo que, en la ecorregión Andina, el alelo silvestre *1 fue el más común (96,32%), en la Costa el alelo mutado *2 fue el más común (7,45%), mientras que en Amazonas el alelo mutado *3 fue el más común (6,25%). A su vez se obtuvo

que la g EM (metabolizadores rápidos) fue más común en poblaciones andinas (94,74%), la g IM (metabolizadores intermedios) en costa (17,02%) y la g PM (metabolizadores pobres) en poblaciones amazónicas (6,25%). (Valencia et al, 2021)

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Generalidades del Citocromo CYP450 2C9 (*CYP2C9*)

La isoforma CYP2C9 o también llamada citocromo CYP2C9 ocupa alrededor del 50% del total de la subfamilia CYP2C siendo la isoforma más abundante, esta participa en el metabolismo de fármacos como (S)-warfarina, losartán, tolbutamida, fenitoína, numerosos AINE y antidepresivos, los cuales son de importancia clínica (Vicente et al., 2014). Este citocromo se encarga de metabolizar alrededor del 15% de fármacos, y el gen que lo codifica evidencia polimorfismos genéticos los cuales puede variar su presencia según población, etnias y ubicación geográfica. (Alvarado et al., 2019)

Los alelos mutados *2 y *3 presentan una significativa reducción de actividad enzimática, los individuos que presentan dos de estos alelos se les denomina metabolizadores lentos de los sustratos del CYP2C9, ya que estos oxidan los fármacos más lentamente que los que presentan el alelo silvestre *1 o alelo wild type, las respuestas de estos alelos hacen a las personas más o menos vulnerables al avance de la enfermedad (Sausville et al., 2018, p. 4866) o pueden generar reacciones adversas a medicamentos como neurotoxicidad, hemorragias gastrointestinales y problemas cardiovasculares (Sangkuhl et al., 2021).

Tabla 1.

*Características de los alelos *1, *2, *3*

Gen	Alelo	Cambios de nucleótidos	Actividad enzimática
CYP2C9	* 1 (tipo salvaje)	Ninguno	Normal
	* 2	430C> T	Disminuido
	* 3	1075A> C	Disminuido

Nota. *1 representa el alelo de tipo salvaje o normal, *2 y *3 alelos mutados.

1.2.2. Genotipo y fenotipo

La actividad de cada enzima codificada por la combinación de alelos en estrella CYP450 se clasifica como metabolizador pobre (PM), metabolizador intermedio (IM), metabolizador normal (NM). Algunos de estos genes son altamente polimórficos con múltiples alelos y la predicción de fenotipos mediante la detección de polimorfismos de genes CYP que son importantes para el metabolismo de los fármacos es fundamental en la farmacoterapia (Goh et al., 2017)

Alvarado et al (2019) señala que cuando una persona es portadora de dos alelos de función reducida, sean estos *CYP2C9*2/*2*, *CYP2C9*3/*3* o *CYP2C9*2/*3*, se configura un genotipo predictor de metabolismo lento. Los genotipos implicados en el metabolismo intermedio se generan cuando se presenta un alelo de función normal y otro de función reducida *CYP2C9*1/*2* ó *CYP2C9*1/*3*, mientras que para el genotipo compuesto por el alelo *1/*1 se le considera un genotipo de metabolismo normal.

1.2.3. Polimorfismos de un solo Nucleótido

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es la variación de un solo nucleótido en una posición determinada del genoma, lo cual puede generar una alteración que cause o no un trastorno; además están asociados al aumento de la susceptibilidad de una enfermedad al influir

en la estructura del ARN mensajero (ARNm), a esto se le suma la relación en el metabolismo de fármacos, siendo de importancia la identificación genética de un individuo. (Xiong et al., 2020). Además, para que estas variaciones sean consideradas como un SNP, deben estar presentes en más del 1% de la población. (Gazendam et al., 2022)

Los estudios sobre SNP, en poblaciones humanas, describen la diversidad que se encuentran en una determinada población, haciendo que la detección de variaciones en estas, sean más predecibles; siendo de importancia para determinar marcadores de estados de enfermedad, fenotipo, ascendencia e identidad individual. (Farris et al., 2018)

Estos SNP están asociados en el desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer, la diabetes; es por ello que la búsqueda de métodos para discriminar SNP resultan importantes en la predicción de enfermedades, para poder dar un diagnóstico clínico personalizado. (Hu et al., 2019)

Los SNP se encuentran en diferentes porcentajes en una población, lo que explicaría la diversidad fenotípica de los individuos. Dentro de los SNP, existe un grupo que se creía no altera la secuencia de la proteína resultante, conocidos como SNP silenciosos; pero diferentes estudios han determinado que influyen en alteraciones moleculares funcionales, además pueden alterar la función y expresión del fenotipo. (Ho et al., 2011).

La recopilación de SNP's, ayuda en la predicción del riesgo a una enfermedad de una persona a futuro, también para estimar el efecto de un tratamiento futuro, como una terapia dirigida. (Pour et al., 2020). En los últimos años, diversos estudios han permitido la medición de SNP's a lo largo del genoma, lo cual ha permitido identificarlos y asociarlos a diversas enfermedades. (Zhu & Zhou, 2020)

1.2.4. Definición de términos básicos

- **Gen:** Secuencia de ADN determinante de un rasgo o característica observable de un organismo. (Susman, 2001)
- **Isoforma:** Productos del mismo gen con modificaciones después de la traducción. (Aranda & Di Carlo, 2022)
- **Homocigoto:** Organismo posee dos copias idénticas para un gen específico. (Bueno, 2011)
- **Heterocigoto:** Organismo que porta en cada uno de los homólogos un alelo diferente. (Bueno, 2011)
- **Caucásico:** Individuo con ascendencia (ancestros originarios) de Europa, Oriente Medio y Norte de África. (Puig, 2023)
- **Frecuencia alélica:** Medida de la proporción relativa de alelos de una población específica. (Filho, 2012)
- **Expresión génica:** Proceso que permite a un organismo generar una respuesta de alta fidelidad al entorno existente mediante la expresión de un subconjunto de genes, a partir de un mismo fragmento de ADN. (Muley & Pathania, 2017)
- **Alelo estrella:** Sistema de nomenclatura utilizado en la clasificación de las variaciones genéticas, que desempeña un papel crucial en la predicción de los efectos funcionales de las diferencias genéticas en los farmacogenes. (Ahn et al, 2024)

CAPITULO II. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación y diseño de investigación

El presente estudio es descriptivo analítico.

2.2. Población, muestra y criterio de selección.

2.2.1. Población

La población objetivo fueron los estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que cursaban octavo, noveno y décimo ciclo, los cuales hicieron un total de 229 personas.

2.2.2. Muestra

El tamaño de la muestra se definió usando la fórmula para estudios cuantitativos de población finita, con el 95% de confiabilidad y con un margen de error del 5%, obteniendo un tamaño muestral de 144 estudiantes, de ambos sexos. No obstante, tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión establecidos, la muestra final quedó conformada por 70 participantes que cumplían con los requisitos definidos para el estudio.

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 pqN}{(Z_{\alpha/2})^2 pq + e^2(N - 1)}$$

n= Tamaño de la muestra de una población N

N= Tamaño de la población

Z= Parámetro estadístico que este sujeto por el nivel de confianza

p= La probabilidad de que ocurra un evento estudiado o probabilidad de éxito

q=La probabilidad de que no ocurra el evento estudiado o evento de fracaso

e= Margen de error

2.2.3. Criterios de selección

2.2.3.1. Criterios de inclusión: Individuo originario del departamento de Lambayeque, mayor de 18 años, que sea estudiante de la Facultad de Ciencias Biológicas, que tenga por lo menos tres generaciones de familiares directos nacidos en Lambayeque.

2.2.3.2. Criterios de exclusión: Individuos que no sean originarios del departamento de Lambayeque, menores de 18 años, que no sean estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas y que no tenga generaciones de familiares directos nacidos en Lambayeque.

2.3. Métodos, técnicas, instrumentos y procedimiento de recolección de datos

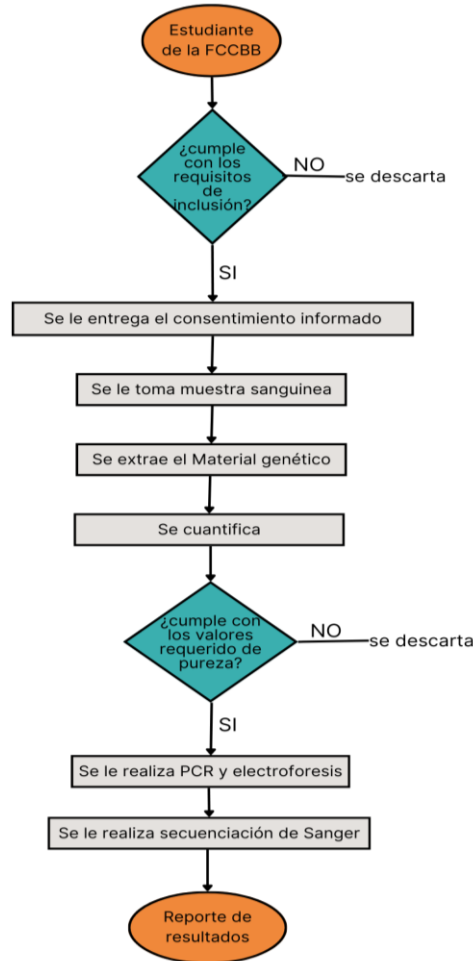
2.3.1. Metodología

2.3.1.1. Flujo de trabajo

El flujo de trabajo empleado consistió en la obtención del consentimiento informado por parte de los estudiantes, recolección y almacenamiento de muestras sanguíneas, extracción del material genético, amplificación del material genético extraído, electroforesis de los amplicones obtenidos y secuenciación de Sanger.

Figura 1.

Flujo de trabajo utilizado para el procesamiento de muestras sanguíneas de los Estudiantes de la FCCBB



Nota. Diagrama elaborado por los autores.

2.3.1.2. Procedimiento de recolección y almacenamiento de muestras sanguíneas.

Las muestras fueron colectadas en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas, se recolectó mediante venopunción 3 ml de sangre periférica total anticoagulada en tubos vacutainer con EDTA, cada tubo se rotuló con nombre, edad y código. Se obtuvieron un total de 70 muestras de sangre periférica de los alumnos que aceptaron participar del estudio después de haber firmado el consentimiento informado. Posteriormente se guardaron a 4°C por un tiempo máximo de 48 horas hasta su extracción de material genómico.

2.3.1.3. Extracción de ADN

El procedimiento de extracción de ADN se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. El ADN total se extrajo utilizando el **kit EasyPure Viral DNA/RNA (TransGen Biotech)**, el protocolo fue modificado de acuerdo a las características de las muestras. La extracción de ADN tuvo los siguientes pasos: **1.** Se agregó 20 μL de proteinasa K a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml junto con 200 μL de BB5 y se mezcló con un vórtex durante 15 segundos. **2.** Se agregó 200 μL de muestra al tubo de microcentrífuga y se mezcló con un vórtex durante 15 segundos. **3.** Se llevó a incubar a 56°C durante 15 minutos. **4.** Se añadió 250 μL de etanol anhidro (puede aparecer floculación en esta etapa) y se mezcló mediante agitación por vortex durante 15 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. **5.** Se transfirió todo el contenido a una columna de centrifugación, y se centrifugó a 12000 xg durante 1 minuto y se desechó el flujo. **6.** Se añadió 500 μL de WB5 y se centrifugó a 12000 xg durante 1 minuto y se desechó el flujo **7.** Se repitió el paso 6 una vez más. **8.** Se centrifugó la columna a 12000 xg durante 1 minuto para eliminar completamente el etanol residual. **9.** Se calentó el agua libre de RNasa a 30°C. **10.** La columna se colocó en un tubo esteril de 1,5 ml sin RNasa. **11.** Se agregó 20 μL de agua libre de RNasa al centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se procedió a centrifugar a 12000 xg durante 1 minuto. **12.** Se repite el paso 11 para poder tener una correcta elución del ADN. **13.** Se guardó el ADN eluido a -20 °C.

2.3.1.4. Secuencia de cebadores

Los cebadores utilizados para los SNPs rs1799853 y rs1057910, fueron diseñados con los softwares Primer3, Blast, Genome Browser y Oligo Analyzer. Para el diseño de la secuencia de los cebadores se tomó como referencia la secuencia completa del gen *CYP2C9* disponible en el NCBI, a partir de la cual se comenzó a seleccionar fracciones de la secuencia que fueron llevadas a los softwares Blast y Primer3, hasta encontrar el par de cebadores que amplifique la

región de interés. Para verificar que estos primers eran específicos se llevó al software Genome Browser en donde se utilizó la opción de PCR in-silico. También se utilizó el programa Oligo Analyzer en donde pudimos obtener su porcentaje de GC, temperatura de fusión (Tm), peso molecular, entre otros. Este programa nos permitió minimizar la dimerización es decir predecir posibles estructuras secundaria que puede formar el oligo.

Tabla 2.

Secuencias de cebadores diseñados para la detección de los alelos mutados 2 y *3*

GEN	ALELO/SNP	Secuencias de los cebadores (5' - 3')	Tm (°C)	Rango de Tamaño (PB)
CYP2C9	CYP2C9*2/ rs1799853	F: TCATGACGCTGCGGAATTTT	58.9	205
		R: GAGGACTCATAATGAAAGATA	50.1	
	CYP2C9*3/ rs1057910	F: GCCACATGCCCTACACAGAT	61.8	210
		R: ACCCGGTGATGGTAGAGGTT	63.9	

Nota: F: Cebador Sentido; R: Cebador antisentido; Tm: Temperatura de Melting

2.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR convencional.

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante una PCR convencional, Peña et al (2013) define a esta técnica como un método que simula de manera in vitro el proceso de replicación de ADN y así crear millones de copias de una región específica en poco tiempo.

Por cada individuo se realizaron dos reacciones, esto debido a que son dos SNP's los que se están estudiando. La PCR tuvo como componentes al ADN molde, enzima ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ion magnesio (Mg +), solución amortiguadora o buffer y agua libre de nucleasas. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 Ml por tubo y se utilizaron los productos M8291(Gotaq ADN Polimerasa) y U1515 (dNTP) de la marca PROMEGA. Se utilizó un termociclador punto

final de la marca Applied Biosystems; las condiciones, volúmenes y temperaturas se estandarizaron tomando en cuenta los reportes de los artículos revisados de las bases de datos.

Tabla 3.

*Condiciones de la PCR para amplificar los alelos mutados *2 y *3*

COMPONENTES	[Inicial]	Volumen (ul)	[Final]
Agua	-	11.3	-
Buffer de la reacción	5X	5.00	1X
MgCl₂	25mM	4.00	4.0mM
dNTPs	10mM	0.50	200 uM
Forward	10uM	1	1 uM
Reverse	10uM	1	1 uM
Taq Polimerasa	5u/ul	0.2	1 u/ul
ADN		2.00	
Volumen Total		25.00ul	

Tabla 4.

*Condiciones térmicas de la PCR para amplificar los alelos mutados *2 y *3*

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Pre-denaturación	95°C	5 minutos	1
Denaturación	94°C	30 segundos	
Alineamiento	58°C- 58.7°C	30 segundos	35
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión Final	72°C	7 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Nota: La temperatura de Alineamiento fue de 58°C y 58.7°C para los cebadores de los alelos mutados *2 y *3

2.3.3. Electroforesis

Para poder observar que se ha llevado de manera correcta la PCR, los productos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v, compuesto por 1g de agarosa y 100 ml de TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1mM, pH 8,0), dejamos enfriar unos minutos y se agregó 6 uL de bromuro de etidio. Se dejó polimerizar el gel por 30 minutos en placas que contenían un peine generador de pocillos, posterior a esto se cubrió el gel con TAE 0.5X, y se adicionaron 10uL de los amplicones obtenidos y 5uL del marcador de peso molecular. Se trabajó a 100V durante 40 minutos. Finalmente se expuso a luz UV en el transiluminador para la observación de los amplicones.

2.3.4. Polimorfismo de conformación de Cadena simple (SSCP)

Es una técnica basada en los patrones de migración de las estructuras secundarias de las moléculas de ADN de cadena sencilla (Pasookhush et al., 2021), las diferencias únicas de bases se distinguen en la movilidad electroforética en condiciones nativas (Rabalski et al., 2014).

SSCP puede identificar más del 90% de una mutación en fragmentos de hasta 200 nucleótidos y más del 80% en fragmentos entre 300-400 nucleótidos (Pasookhush et al., 2021), los geles deben tener condiciones de pH bajo y alto porcentaje de acrilamida, el tampón electroforético debe tener alta fuerza iónica y pH bajo, adicional a ello se debe realizar el mínimo de ciclos de PCR. (Gupta & Agarwal, 2003)

Está asociada con los siguientes pasos: amplificación por PCR de las secuencias de ADN de interés, desnaturalización del ADN bicatenario a monocatenario, disminución rápida de la temperatura del ADN monocatenario para la autohibridación sin reasociarse a la cadena complementaria y finalmente la detección de las conformaciones de ADN monocatenario en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. (Konsiri et al., 2019)

Se utilizó el protocolo de Benites (2013) con algunas modificaciones, el cual señala que los productos amplificados de la PCR, se someten a una corrida electroforética conformacional en gel de Poliacrilamida al 6%, Los productos de PCR fueron cargados con Buffer SSCP y calentados a 96°C durante 10 minutos y luego enfriados rápidamente a 4°C durante 10 minutos. La corrida se prolongó durante 5 horas a 150V y bajo refrigeración a una temperatura de 8°C, con buffer TBE 1X helado.

Tabla 5.

Composición del gel SSCP (Poliacrilamida al 6%)

Composición	Vol. (35 ml)
TBE 5X	3,5mL
Acrilamida/Bisacrilamida 49:1	4.2mL
Glicerol	3.5mL
Agua destilada	23,33mL
APS 10%	430 µL
TEMED	43 µL

Tabla 6.

Condiciones para la desnaturalización de los productos amplificados

Reactante	(n=1)
Producto PCR (CYP2C9*2 O CYP2C9*3)	5-8µl
Buffer SSCP (Azul de Bromofenol 0.1%, Xilencyanol 0.1%, formamida 90%, EDTA 20Mm)	3µl

Nota: La cantidad de producto PCR añadido varía según su peso molecular previa estandarización.

Tabla 7. *Edición del programa para la desnaturalización de los productos amplificados*

Fase del PCR	Temperatura °C	Tiempo
1	96	10 min
2	4	10 min

Nota. La fase 1 corresponde a la desnaturalización inicial y la fase 2 a la conservación del producto para su no rehibridación.

2.3.4.1. Interpretación de los perfiles de PCR-SSCP

Las conformaciones de los fragmentos monocatenarios migran a través del gel de poliacrilamida a diferentes velocidades lo que permite su separación. Una migración diferente o un cambio en el patrón de corrida será considerado como una secuencia mutada o que tiene una alteración en su estructura plegada.

2.3.5. Secuenciación de Sanger.

Se envió a un laboratorio externo.

2.3.6. Aspectos éticos

La presente investigación contará con un consentimiento informado que será entregado a los participantes. El protocolo fue aprobado por el comité científico de la facultad durante la evaluación para la aprobación del proyecto de investigación; por ello, no fue necesario enviarlo al comité de ética de la universidad.

2.4. Procesamiento y análisis de datos

La comparación de las frecuencias genotípicas esperadas con las observadas se evaluará con el Equilibrio de Hardy-Weinberg.

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1. Amplificación de las regiones genómicas que contienen a los SNP's rs1799853 (*2) y rs1057910 (*3)

SNP's rs1799853 (*2) y rs1057910 (*3) ó alelos mutados *2 y *3. Las secuencias de las regiones genómicas de interés fueron obtenidas de GENBANK del NCBI, y posteriormente se emplearon herramientas bioinformáticas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y Primer3 para la obtención de los posibles cebadores. Posterior a esto se utilizó la plataforma de la UCSC Genome Browser, la cual permitió observar la posición exacta de los alelos mutados *2 y *3 (**Figura 03**). Este análisis permitió asegurar la especificidad de la región a amplificar y descartar la posibilidad de amplificación inespecífica debido a similitudes con otros genes.

El resultado *in silico* mostró que los cebadores diseñados *de novo* amplifican secuencias de 205 pb y 210 pb para el alelo mutado *2 y alelo mutado *3 respectivamente. El resultado experimental por PCR y electroforesis mostró que los cebadores amplifican dichas secuencias como se observa en **la Figura 04**. Se visualizaron bandas por sobre los 200 pb de acuerdo con el marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 3.

*Identificación y validación de los cebadores del SNP rs1799853 C/T (Alelo mutado *2) del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowser*

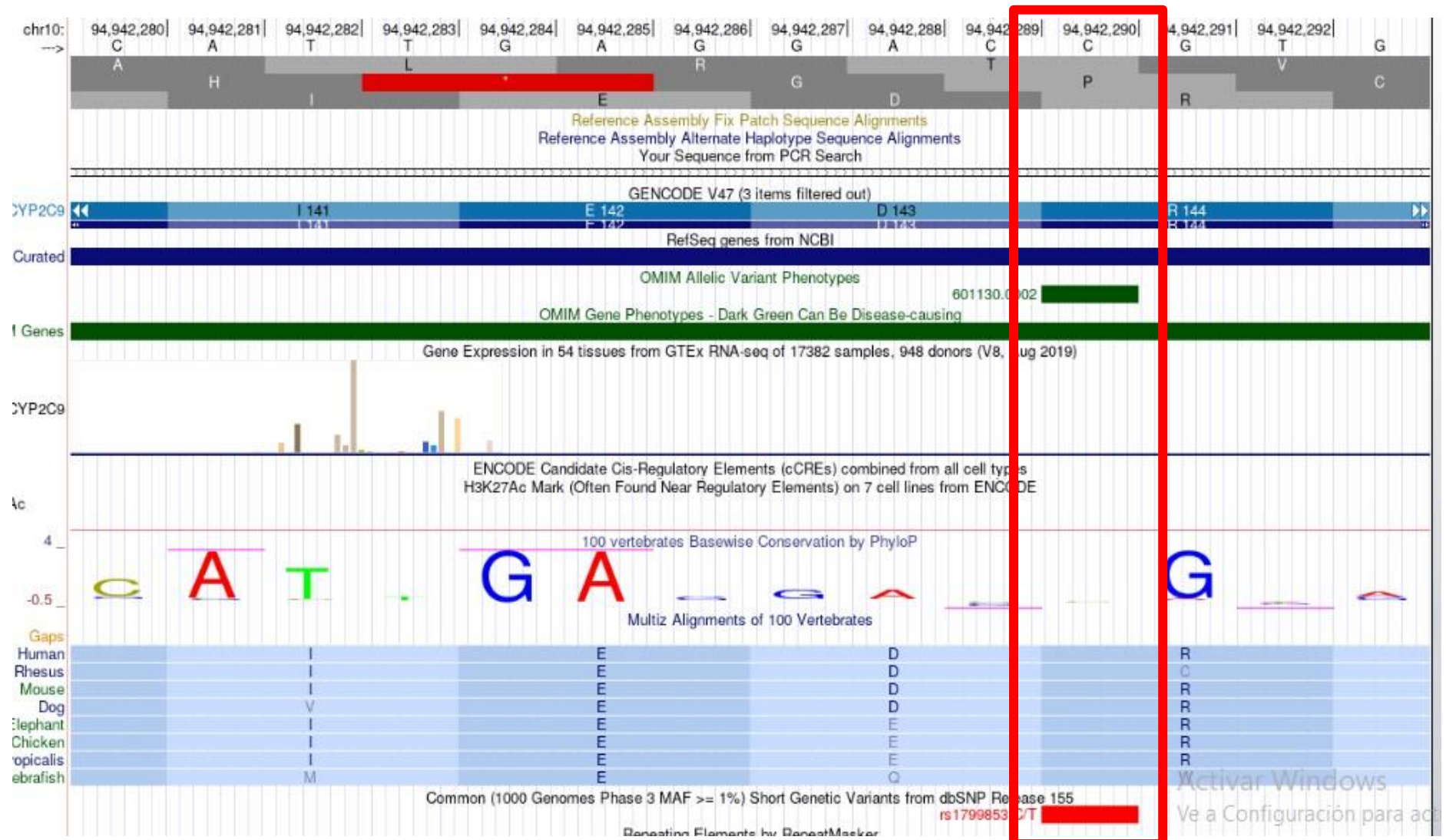


Figura 4.

*Identificación y validación del SNP rs1057910 (Alelo mutado *3) A/C/G del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowse*

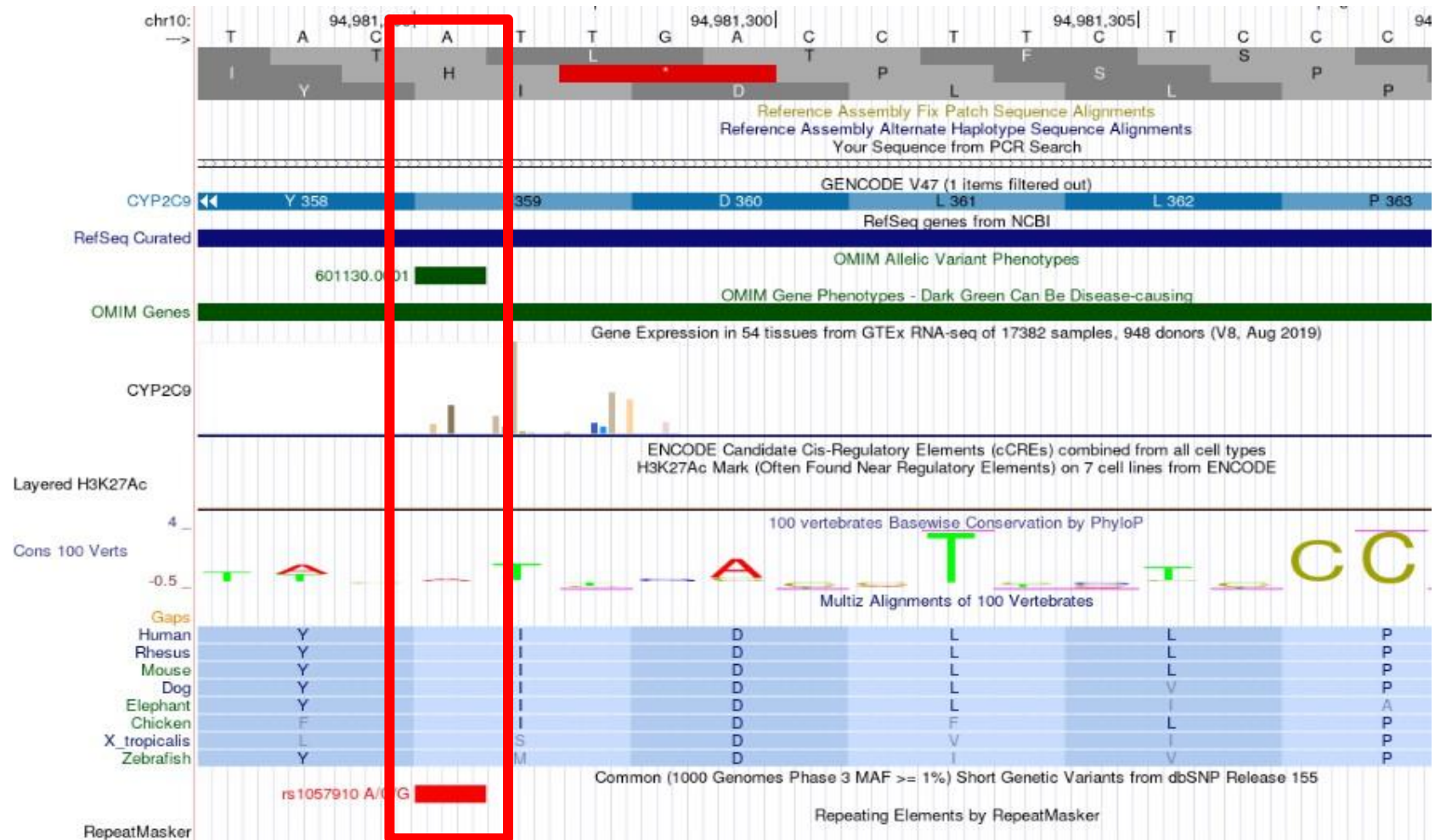
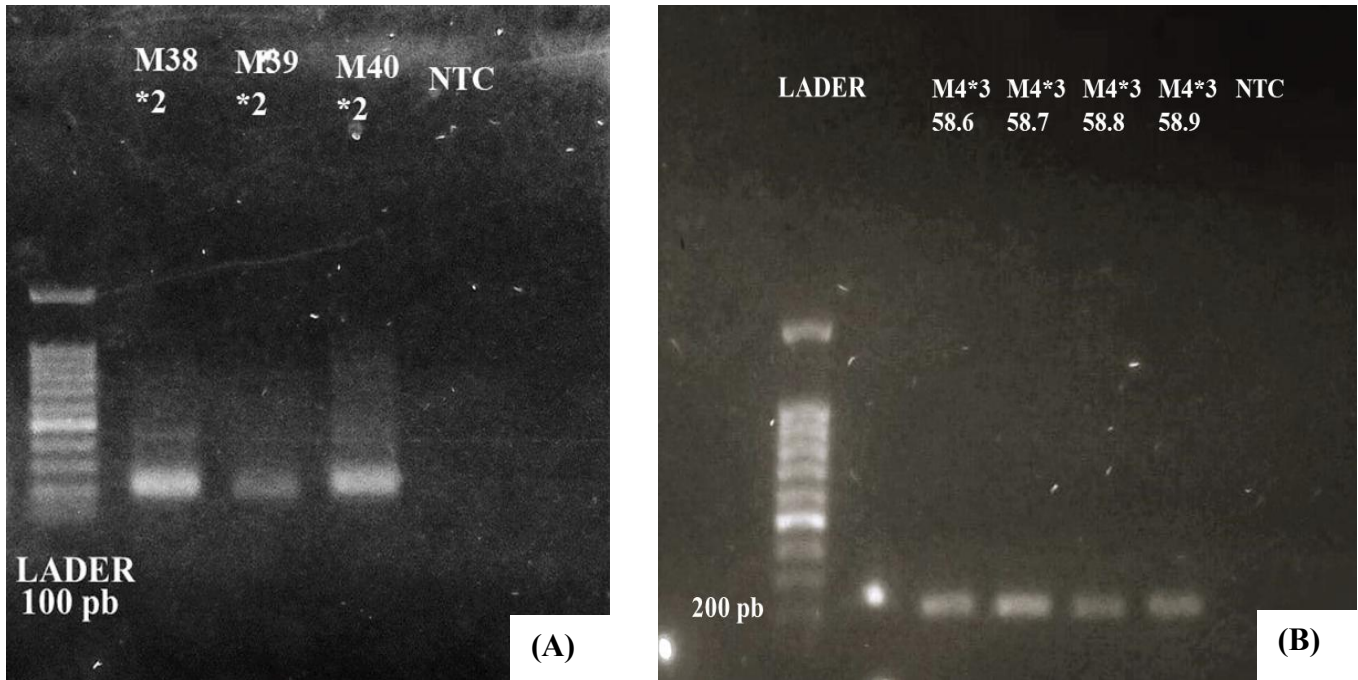


Figura 5.

Visualización, validación y estandarización mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa de los primers diseñados para los alelos mutados *2 y *3



Nota: Carril 1: marcador de peso molecular Ladder de 100 pb. **(A)**. Producto de PCR de las muestras 38,39 y 40 hibridadas a 58°C para el alelo mutado *2 **(B)**. Producto de PCR de la muestra 4 hibridada a 58.6°C, 58.7°C, 58.8°C y 58.9°C para el alelo mutado *3.

3.2. Estimación de las frecuencias genotípicas

Para la identificación de variantes, se desarrollaron experimentos de SSCP, los cuales permitieron identificar las variantes alélicas presentes en la población. Los resultados mostraron que los geles de los alelos mutados *2 y *3 mostraron 4 patrones distintos. Para el alelo mutado *2 se visualizó un patrón único (A*2) para las 70 muestras **(Figura 05)**. Para el alelo mutado *3 se visualizaron 3 patrones, 2 muestras para el patrón A*3 (2,9%), 53 muestras para el patrón B*3 (75,7%) y 15 muestras para el patrón C*3 (21,4%) (Figura 06).

Figura 6.

*Visualización del producto de PCR-SSCP en gel de poliacrilamida para el alelo mutado *2*

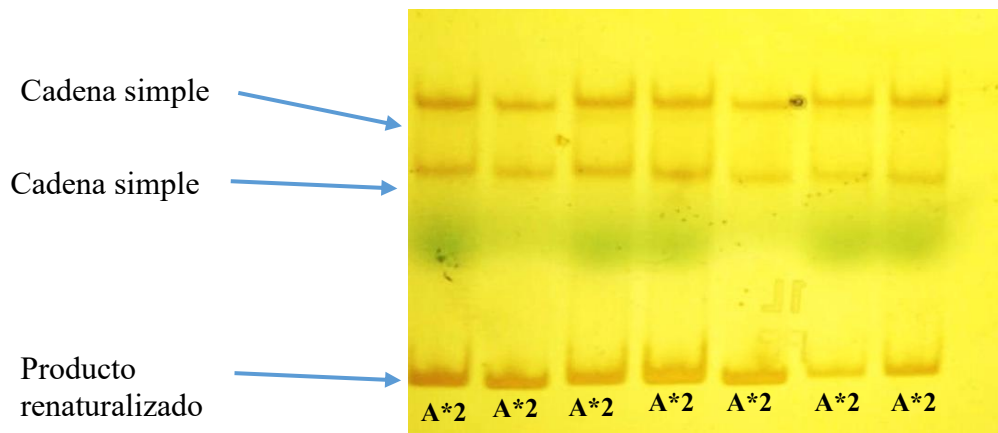
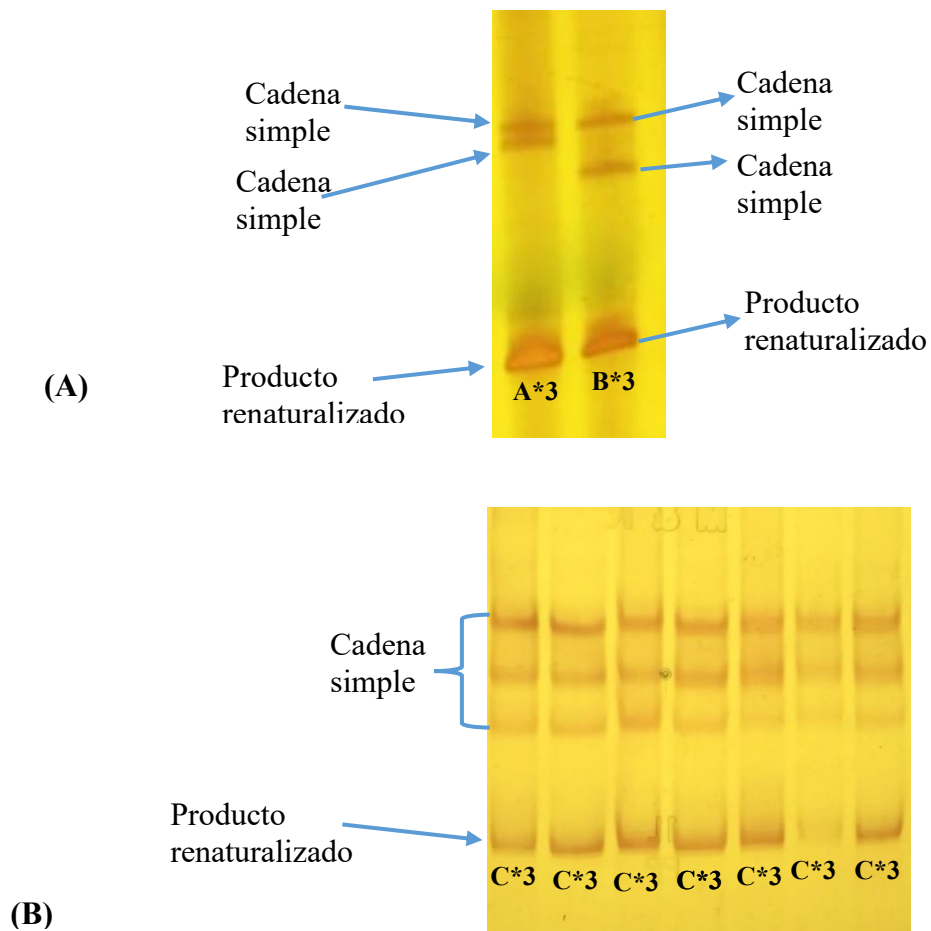


Figura 7.

*Visualización del producto de PCR-SSCP en gel de poliacrilamida para el SNP rs1057910(*3). (A) Patrón A y B. (B) Patrón C.*



3.3. Equilibrio De Hardy-Weiberg

3.3.1. Alelo mutado *2 (SNP rs1799853)

Para el alelo mutado *2 C/T, se visualizó un patrón único (A*2) para las 70 muestras. Para determinar si se encontraba en equilibrio se aplicó la ecuación de Hardy-Weinberg la cual es

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde tenemos que:

- p es la frecuencia del alelo normal (C).
- q es la frecuencia del alelo mutado (T).
- p^2 es la frecuencia de los homocigotos normales (CC).
- pq^2 es la frecuencia de los heterocigotos (CT).
- q^2 es la frecuencia de los homocigotos mutados (TT).

Todas las muestras presentan un mismo patrón (A), lo cual indica que todas presentan el mismo genotipo, en este caso el genotipo CC el cual se consideraría un homocigoto normal.

a) Frecuencia genotípica.

$$p^2 = \frac{70}{70} = 1 = \sqrt{1} = 1$$

b) $p+q=1$

$$q = 1 - 1 = 0$$

c) Despejamos los demás valores

$$2pq = 2(1)(0) = 0$$

$$q^2 = 0^2 = 0$$

La frecuencia del alelo mutado no se encuentra presente en la población y no hay presencia de individuos heterocigotos, por lo cual se determina que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

3.3.2. Alelo mutado *3 (SNP rs1057910)

Para el alelo mutado *3 A/C/G se visualizaron 3 patrones, 2 muestras para el patrón A*3 (2,9%), 53 muestras para el patrón B*3 (75,7%) y 15 muestras para el patrón C*3 (21,4%).

- Patrón A*3: Homocigoto Mutado (CC O GG)
- Patrón B*3: Homocigoto Normal (AA)
- Patrón C*3: Heterocigotos (AC O AG)

Para determinar si se encontraba en equilibrio se aplicó la ecuación de Hardy-Weinberg la cual es

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde tenemos que:

- p es la frecuencia del alelo normal (A).
- q es la frecuencia del alelo mutado (C o G).
- p² es la frecuencia de los homocigotos normales (AA).
- pq² es la frecuencia de los heterocigotos (AC o AG).
- q² es la frecuencia de los homocigotos mutados (CC o GG)

a) Frecuencia genotípica

$$f(CC \text{ o } GG) = \frac{2}{70} = \mathbf{0.0285}$$

$$f(AA) = \frac{53}{70} = \mathbf{0.7571}$$

$$f(AC \text{ o } AG) = \frac{15}{70} = \mathbf{0.2142}$$

b) Frecuencia del alelo normal A (p):

$$p = f(AA) + \frac{1}{2}f(AC \text{ o } AG)$$

$$p = 0.7571 + \frac{1}{2}(0.2142) = \mathbf{0.8642}$$

d) Frecuencia del alelo mutado C o G (q):

$$q=1-p= 1-0.8642= \mathbf{0.1358}$$

e) Frecuencias esperadas:

- $p^2 = (0.8642)^2 = 0.7468 = 52.20$ individuos para AA
- $2pq = 2(0.8642) \times (0.1358) = 0.2348 = 16.44$ individuos para AC o AG
- $q^2 = (0.1358)^2 = 0.0184 = 1.29$ individuos para CC o GG

f) Frecuencias observadas:

- $p^2 = 0,7571 = 53$ individuos para AA
- $2pq = 0,2142 = 15$ individuos para AC o AG
- $q^2 = 0,0285 = 2$ individuos para CC o GG

Tabla 8.

*Frecuencias génicas y genotípicas para los alelos mutados *2 y *3*

	Genotipo	N	%	Alelo	N	Frecuencia
CYP2C9*2	C/C (*1/*1)	70	100	T (*2)	0	0
	C/T (*1/*2)	0	0			
	T/T (*2/*2)	0	0	C	70	1
	Total	70	100.00			
CYP2C9*3	A/A (*1/*1)	53	75.71	C (*3)	0	0
	A/C (*1/*3)	15	21.42			
	C/C (*3/*3)	2	2.87	A	70	1
	Total	70	100.00			

Nota: El resultado muestra la presencia de heterocigotos para el alelo mutado *3 sin embargo, los valores esperados son muy similares a los observados.

3.3.2.1. Prueba de Chi-Cuadrado (X^2)

La prueba de Chi-cuadrado se empleó para evaluar si las frecuencias genotípicas observadas del alelo mutado *3 (A/C/G) se ajustan al equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada. Este análisis permite detectar posibles desviaciones que podrían estar asociadas a

factores como selección natural, mutación, migración, deriva genética o errores en la genotipificación

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Tabla 9.

*Prueba de Chi-cuadrado para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg del alelo mutado *3.*

Genotipo	Observado(n)	fo	fe	Esperado (n × fe)	(O – E)² / E
AA	53	0.7571	0.7468	52.29	0.0095
AC/AG	15	0.2143	0.2346	16.42	0.1228
CC/GG	2	0.0286	0.0184	1.29	0.3966
Total	—	—	—	—	0.53

Nota. O = valor observado; E = valor esperado; fo = frecuencia observada; fe = frecuencia esperada. La columna $(O - E)^2 / E$ corresponde al cálculo de Chi-cuadrado (χ^2).

El resultado de la prueba fue $\chi^2 = 0.53$ con 1 grado de libertad. El valor crítico para $\alpha = 0.05$ y $gl = 1$ es 3.84. Como el valor de $\chi^2 = 0.53$ es menor que el valor crítico ($0.53 < 3.84$), no se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.

3.3. Comparación de los perfiles de SSCP con la Secuenciación de las regiones genómicas que contienen a los alelos mutados *2 y *3 (rs1799853 y rs1057910)

La tabla 10 presenta la comparación entre el patrón A*2 del alelo mutado *2 y el electroferograma correspondiente a la secuencia genómica de la región de interés. En dicho electroferograma, se observa que en la posición 24 nt, 20 nt y 19 nt de las muestras 2, 3 y 64, respectivamente, se mantiene la presencia de la base nitrogenada citosina (C). Esto indica que

no hay sustitución de bases en dichas posiciones, lo cual sugiere que el patrón de SSCP observado corresponde al alelo silvestre *1 o alelo sin mutación.

Por otro lado, la tabla 11, 12 Y 13 muestran la comparación entre los patrones del alelo mutado *3 con sus respectivos electroferogramas. Para el patrón A*3, se identificó la presencia de la base adenina (A) en las posiciones 21 nt y 20 nt de las muestras 1 y 8, respectivamente. Esto indica que no se observa sustitución de bases en dichas posiciones, lo cual sugiere que el patrón de SSCP corresponde al alelo silvestre *1 o alelo sin mutación.

En el caso del patrón B*3, las muestras 4 y 10 mostraron adenina (A) en las posiciones 23 nt y 19 nt, respectivamente, mientras que la muestra 70 presentó un cambio de base A>C en la posición 21 nt, lo que indica la presencia de un genotipo heterocigoto para este alelo.

Finalmente, en el patrón C*3, las muestras 32 y 33 mostraron un cambio de base A>C en la posición 20 nt, lo cual sugiere la presencia del alelo *3 correspondiente al alelo mutado en esa región.

Tabla 10.

*Electroferogramas de las muestras 2,3 y 64 del Patrón A del alelo mutado *2 (SNP rs1799853) y Alelo 8 (rs79001894)*

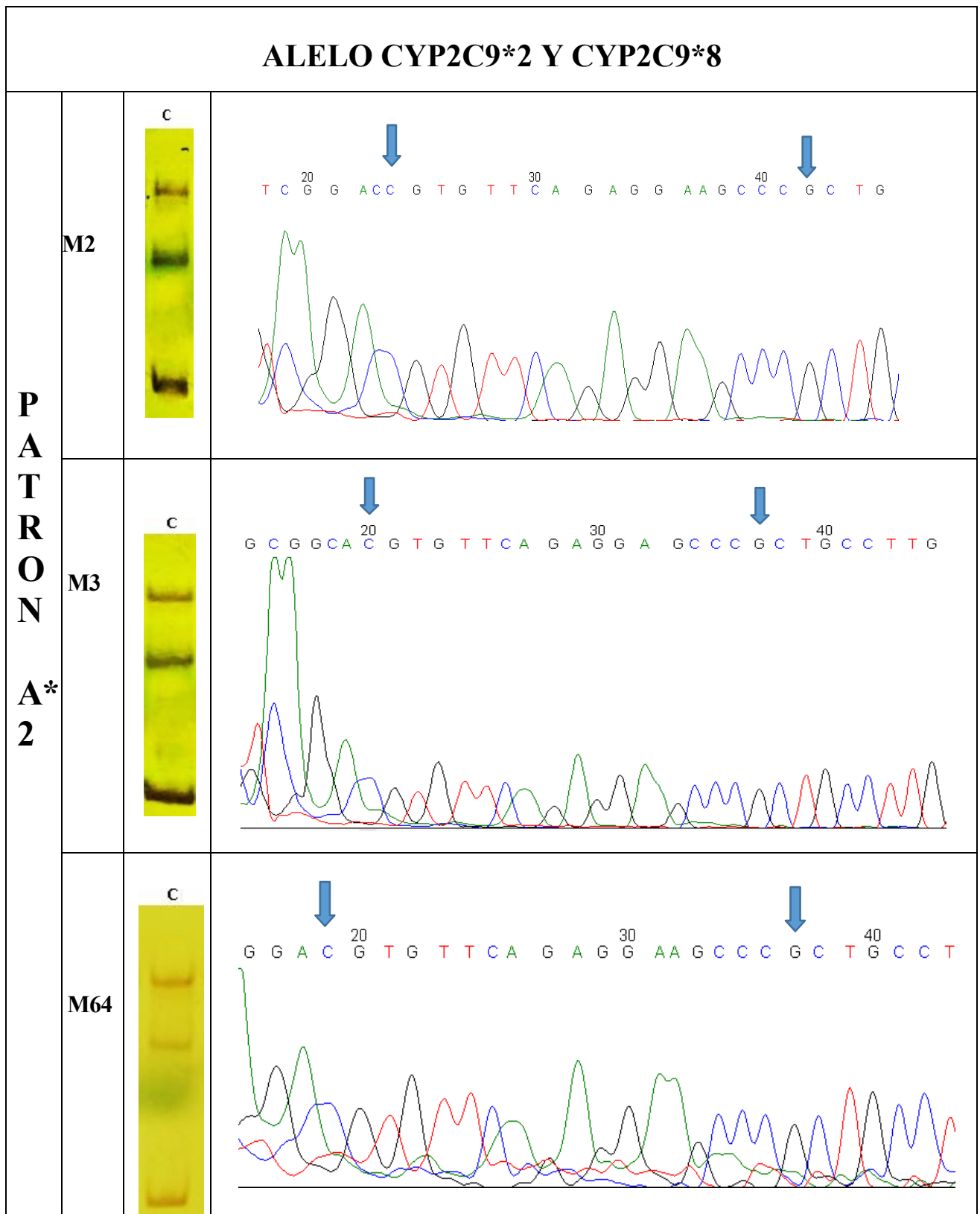


Tabla 11.

*Electroferogramas de las muestras 1,8 del patrón A del Alelo mutado *3 (SNP rs1057910) del Gen CYP2C9*

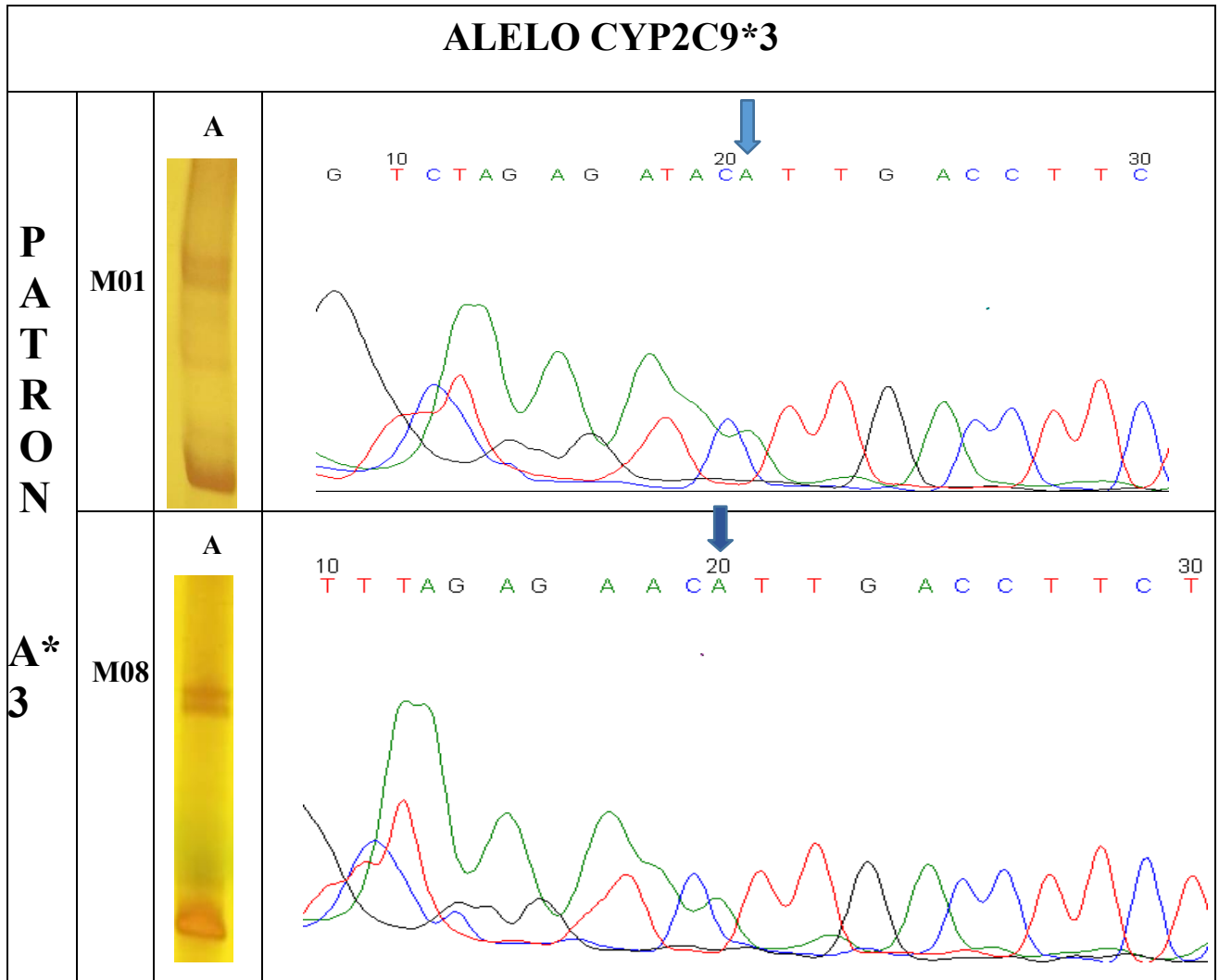
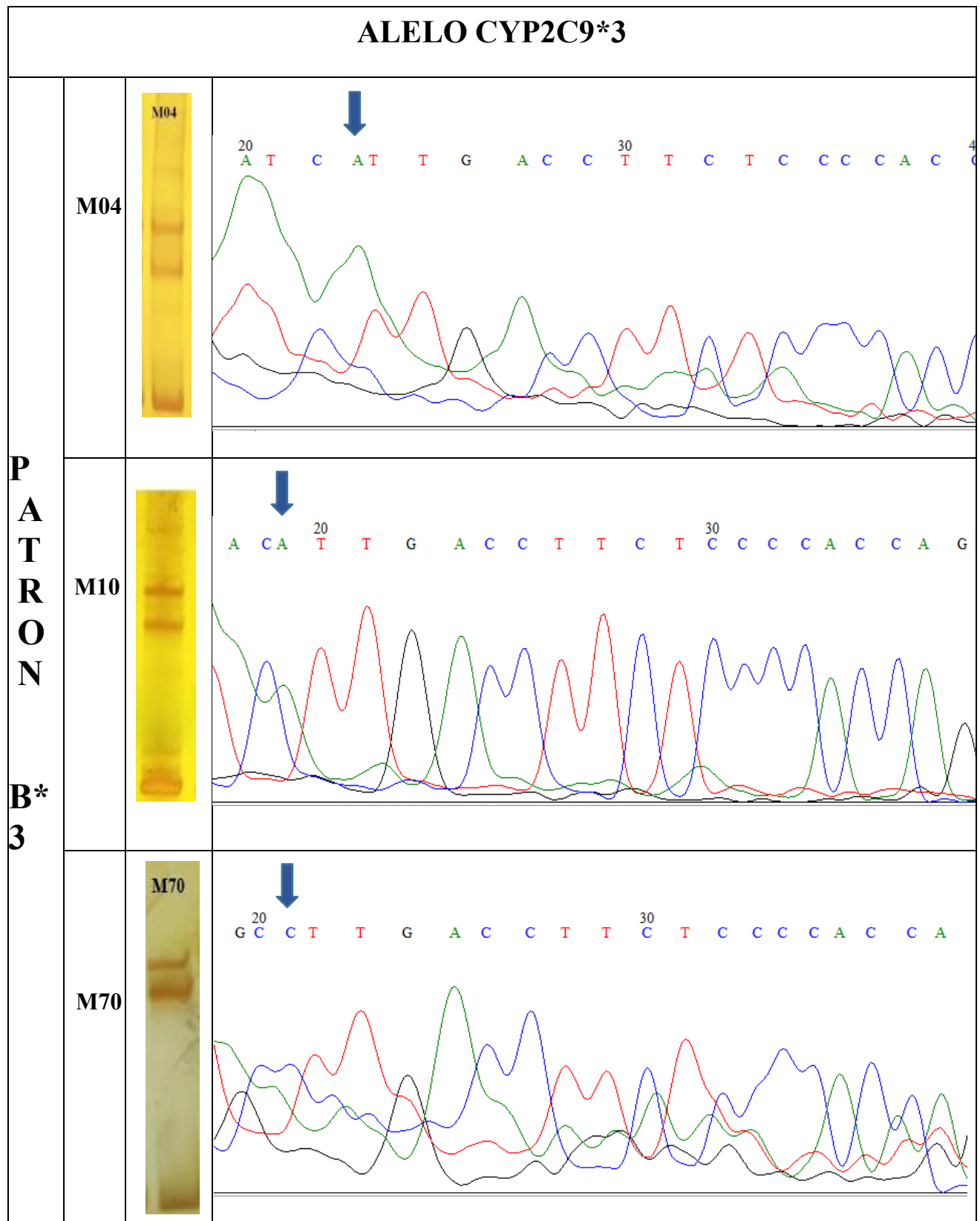


Tabla 12.

*Electroferogramas de las muestras 4,10 y 70 del patrón B del Alelo mutado *3 (SNP rs1057910) del Gen CYP2C9*



3.4 . Comparación poblacional de las secuencias genómicas obtenidas de los estudiantes de la FCCBB-UNPRG

Para la identificación de los SNP's o alelos mutados se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas de los participantes, en el cual se compararon las secuencia de referencia obtenidas del NCBI con las secuencias obtenidas de la secuenciación Sanger. El resultado mostró la ausencia del alelo mutado *2 (SNP rs1799853) en las muestras analizadas (**Figura 07**), asimismo los resultados confirmaron la presencia del alelo mutado *3 (SNP rs1057910) en donde se logró observar el cambio A>C en heterocigosis en las muestras 32, 33 y 70, facilitando su comparación poblacional (**Figura 08**).

De acuerdo con los datos disponibles sobre los tipos de metabolizadores, indican que la mayoría de los participantes del estudio se encuentran dentro de los metabolizadores extensivos y que un pequeño grupo son clasificados como metabolizadores intermedios (**Tabla 14**).

Figura 8.

*Alineamiento de Secuencias de las muestras 2,3 y 64 del alelo mutado *2 (rs1799853) C/T del Gen CYP2C9*



Figura 9.

*Alineamiento de Secuencias de las muestras 1, 8, 4,10, 70, 32 y 33, del alelo mutado *3 (rs1057910) A/C/G del Gen CYP2C9.*

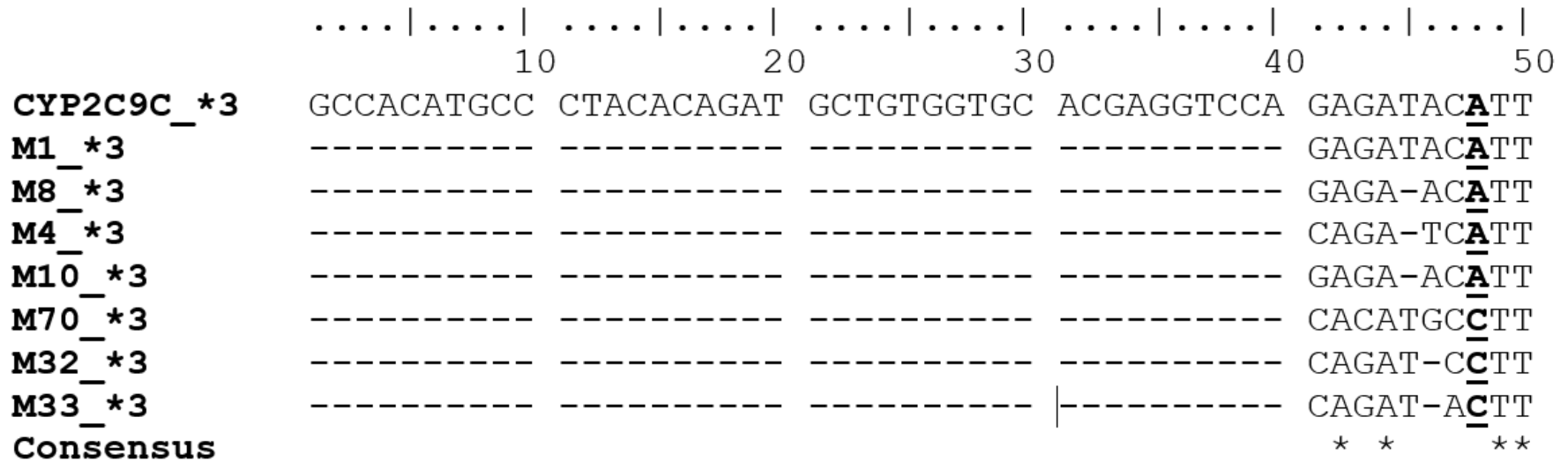


Tabla 14*Comparación poblacional de los tipos de fenotipos metabolizadores de acuerdo con su distribución genómica*

Fenotipo de metabolizadores	% esperado en la población	Genotipo predictivo	Genotipos observados n (%)
	mestiza peruana		
Extensivos (ME)	81.65	*1/*1 ^a	53
Intermedios (MI)	15.13	*1/*2 ^b	0
		*1/*3 ^c	15
Lentos (ML)	3.22	*2/*2	2
		*3/*3	0
		*2/*3 ^d	0

Nota^a Participantes que no portan ninguno de los alelos mutados^b Participantes heterocigotos para *2 que no portan el alelo *3 mutado^c Participantes heterocigotos para *3 que no portan el alelo *2^d Participantes heterocigotos para los alelos *2 y *3

IV. DISCUSION

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg destaca comportamientos genéticos contrastantes en los alelos mutados *2 y *3 (rs1799853 C/T y rs1057910 A/C/G) del gen CYP2C9 en la población estudiada, teniendo relevancia tanto genética como farmacogenética.

Los resultados obtenidos mostraron ausencia de variabilidad genética alelo mutado *2, ya que todas las muestras analizadas presentaron el genotipo homocigoto CC, lo que sugiere una baja frecuencia o incluso ausencia del alelo variante T en esta población estudiantil. Este hallazgo contrasta con lo reportado en otras regiones del Perú y América Latina, donde la frecuencia alélica del alelo mutado *2 puede alcanzar entre el 2 % y el 8 %, dependiendo de la composición genética de la población (De la Cruz et al., 2018; Valencia et al., 2021).

En contraste, el alelo mutado *3 mostró mayor diversidad genotípica, con frecuencias de 75.7 % para el genotipo homocigoto AA, 21.4 % para el heterocigoto AC/AG, y 2.9 % para el homocigoto mutante CC/GG. Este marcador sí se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, indicando una distribución genética estable en la población estudiada. Estudios similares en México, Colombia y Chile han reportado frecuencias del alelo mutado *3 en rangos similares, entre 3 % y 9 % (Rodrigues-Soares et al., 2019; González-Covarrubias et al., 2020). Mientras que el alelo mutado *2 se presenta como una variante fija (genotipo CC en todas las muestras), el alelo mutado *3 muestra una distribución genotípica compatible con el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual respalda su aplicación en estudios farmacogenéticos locales. Esto concuerda con los hallazgos de Naranjo et al. (2018), quienes, desde la Red Iberoamericana de Farmacogenética (CEIBA-RIBEF), han documentado una prevalencia variable de estas variantes según la composición genética regional.

La genotipificación se realizó mediante la técnica PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), que permite identificar variantes alélicas por diferencias en la movilidad conformacional de hebras simples de ADN en geles de poliacrilamida. Esta técnica es sensible a mutaciones puntuales y cambios conformacionales, permitiendo detectar variaciones sin necesidad de secuenciación directa (Orita et al., 1989). En el caso del SNP rs1799853, todas las muestras mostraron un único patrón de corrida (A*2), evidenciando la homogeneidad genética para este marcador en la población estudiada.

En el alelo mutado *3, se identificaron tres patrones distintos: A*3 (homocigotos mutados), B*3 (homocigotos normales) y C*3 (heterocigotos), lo cual permitió asignar con precisión 2, 53 y 15 individuos, respectivamente, a cada genotipo, concordando con los conteos utilizados en la prueba de Hardy-Weinberg. Este tipo de diferenciación por shift conformacional se ha documentado en múltiples estudios latinoamericanos; por ejemplo, Amorim et al. (2004) caracterizaron hasta siete patrones SSCP para el gen CYP1A1 en una cohorte brasileña, subrayando la robustez del método para análisis de variantes metabólicas en la región

En conjunto, la correlación exacta entre los patrones SSCP y los genotipos inferidos respaldan la confiabilidad de la plataforma experimental empleada. Además, refuerza la validez de las conclusiones sobre equilibrio o no equilibrio de Hardy-Weinberg para cada SNP. La aplicación de PCR-SSCP continúa siendo una alternativa útil y asequible para tamizaje genético a gran escala en poblaciones sudamericanas, donde los recursos para secuenciación masiva pueden ser limitados.

La implementación de pruebas farmacogenómicas previas a la prescripción de medicamentos que son metabolizados por CYP2C9, sería fundamental para mejorar la seguridad terapéutica. Tal y como expresan Anghel et al. (2024), en la evaluación de la variación genética en la respuesta de fármacos, debido a los SNP pueden surgir múltiples

variaciones genéticas, por lo cual la estructura o función de una proteína o enzima se ve alterada, teniendo consecuencias funcionales, en donde se puede tener una ganancia de función o una actividad reducida o inexistente por las variantes de pérdida de función.

Este estudio representa un punto de partida importante para el análisis genético en la región de Lambayeque, al evaluar variantes del gen CYP2C9 en una población estudiantil. Los resultados muestran ausencia de variabilidad en uno de los SNPs y diversidad genética en otro, lo que sugiere posibles implicancias farmacogenéticas. Además, la técnica utilizada demostró ser confiable y accesible. Estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de una medicina personalizada más segura y efectiva. Se recomienda ampliar este tipo de investigaciones a otras regiones del país para fortalecer el conocimiento genético de la población peruana.

V. CONCLUSIONES

- Se logró analizar los polimorfismos *rs1799853 (CYP2C9*2)* y *rs1057910 (CYP2C9*3)* en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (2023–2024), utilizando herramientas de biología molecular (PCR-SSCP), secuenciación de Sanger y principios de genética de poblaciones, lo que permitió caracterizar la variabilidad genética de estos SNPs en la muestra estudiada.
- Se detectaron exitosamente las regiones que contienen los SNPs *rs1799853* y *rs1057910* y el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg reveló que *rs1799853 (CYP2C9*2)* no mostró variabilidad en cambio, *rs1057910 (CYP2C9*3)* sí presentó variación genotípica lo que sugiere una distribución genética estable en la población estudiada.
- Se compararon los genotipos obtenidos para ambos SNPs, se observó que el SNP *rs1799853* no presentó variación genética, ya que todas las muestras fueron del mismo genotipo (CC). Esto indica que este marcador está genéticamente fijado en la población analizada. En cambio, el SNP *rs1057910* mostró una mayor diversidad de genotipos, lo que indica que existe variabilidad genética activa para este marcador en los estudiantes evaluados.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con estudios genómicos a nivel poblacional que permitan identificar variantes genéticas asociadas a posibles patologías metabólicas. Estos estudios son fundamentales para comprender mejor la predisposición genética en distintas poblaciones y para establecer estrategias de prevención y tratamiento más efectivas.
- Es importante desarrollar investigaciones en el área de la farmacogenómica, considerando un enfoque poblacional. Esto permitirá evaluar cómo las variantes genéticas presentes en una población específica influyen en la respuesta a distintos fármacos, contribuyendo a una medicina más personalizada y segura.
- Se recomienda incorporar tecnologías avanzadas como la PCR en tiempo real con sondas específicas y la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Estas metodologías permiten una detección más precisa y eficiente de variantes genéticas, lo cual es esencial para estudios de diagnóstico molecular, investigación biomédica y aplicaciones clínicas en medicina personalizada.

VII. REFERENCIAS

- Ahmed, S., Altaf, N., Ejaz, M., Altaf, A., Amin, A., Janjua, K., Khan, A. U., Imran, I., & Khan, S. (2020). Variations in the frequencies of polymorphisms in the CYP2C9 gene in six major ethnicities of Pakistan. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76366-x>
- Ahn, S. H., Park, Y., & Kim, J. H. (2024). Contradiction in star-allele nomenclature of pharmacogenes between common haplotypes and rare variants. *Genes*, *15*(4), 521.
<https://doi.org/10.3390/genes15040521>
- Alvarado, Á. T., Muñoz, A. M., Loja, B., Miyasato, J. M., García, J. A., Cerro, R. A., Quiñones, L. A., & Varela, N. M. (2019). Estudio de las variantes alélicas CYP2C92 y CYP2C93 en muestras de población mestiza peruana. *Biomédica*, *39*(3), 1–9.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4636>
- Amorim, L., Falagan, P., Almeida, T., de Moura, C., & Ribeiro, L. (2004). Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *547*(1–2), 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.11.004>
- Anghel, S. A., Dinu-Pirvu, C., Costache, M., Voiculescu, A. M., Ghica, M. V., Anuța, V., & Popa, L. (2024). Receptor pharmacogenomics: Deciphering genetic influence on drug response. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(17), 9371.
<https://doi.org/10.3390/ijms25179371>

- Aranda, M. A., & Di Carlo, M. B. (2022). Fosfatasa alcalina: características generales y determinación sérica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 56(3), 257–272. <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v56n3/0325-2957-abcl-56-3-02.pdf>
- Bueno, M. L. (2011). Chromosomes as vehicle in organization and transmission of characters. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 43–60. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v16n3/v16n3a3.pdf>
- Cacabelos, R., Naidoo, V., Corzo, L., Cacabelos, N., & Carril, J. C. (2021). Genophenotypic factors and pharmacogenomics in adverse drug reactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13302. <https://doi.org/10.3390/ijms222413302>
- Calderon-Ospina, C. A., Galvez, J. M., López-Cabra, C., Morales, N., Restrepo, C. M., Rodríguez, J., Aristizábal-Gutiérrez, F. A., Velez-van-Meerbeke, A., Laissue, P., & Fonseca-Mendoza, D. J. (2020). Possible genetic determinants of response to phenytoin in a group of Colombian patients with epilepsy. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 555. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00555>
- Cuautle-Rodríguez, P., Rodríguez-Rivera, N., De Andrés, F., Castillo-Nájera, F., Llerena, A., & Molina-Guarneros, J. A. (2019). Frequency of CYP2C9 (*2, *3 and IVS8-109A>T) allelic variants, and their clinical implications, among Mexican patients with diabetes mellitus type 2 undergoing treatment with glibenclamide and metformin. *Biomedical Reports*, 10(5), 1–7. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1204>
- Daly, A. K., Rettie, A. E., Fowler, D. M., & Miners, J. O. (2018). Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and clinical considerations. *Journal of Personalized Medicine*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jpm8010001>

- De la Cruz, M., Romero, A., & Rojas, R. (2018). Frecuencia de polimorfismos genéticos relacionados con la metabolización de fármacos en población peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(4), 618–624.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.354.4023>
- Dorji, P. W., Tshering, G., & Na-Bangchang, K. (2019). CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 polymorphisms in South-East and East Asian populations: A systematic review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 44(4), 508–524.
<https://doi.org/10.1111/jcpt.12835>
- Farris, M. H., Scott, A. R., Texter, P. A., Bartlett, M., Coleman, P., & Masters, D. (2018). TIA: Algorithms for development of identity-linked SNP islands for analysis by massively parallel DNA sequencing. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12859-018-2133-2>
- Filho, J. (2012). Comparación de la frecuencia alélica de 13 loci STRs de la población brasileña y española para fines de identificación humana en genética forense [Tesis doctoral, Universidad de Valladolid].
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/2905/TEISIS328-130603.pdf?sequence=1>
- Gazendam, I., Mojapelo, P., & Bairu, M. W. (2022). Potato cultivar identification in South Africa using a custom SNP panel. *Plants*, 11(12), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/plants11121546>
- Goh, L. L., Lim, C. W., Sim, W. C., Toh, L. X., & Leong, K. P. (2017). Analysis of genetic variation in CYP450 genes for clinical implementation. *PLoS ONE*, 12(1), e0169233.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169233>

- González-Covarrubias, V., Rangel-Villalobos, H., & Rojas-Martínez, A. (2020). Genetic variability of pharmacogenetic markers in Latin American populations: Implications for clinical implementation. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 959.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00959>
- Ho, P. A., Kuhn, J., Gerbing, R. B., Pollard, J. A., Zeng, R., Miller, K. L., Heerema, N. A., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., Franklin, J. L., Lange, B., Gamis, A. S., Alonzo, T. A., & Meshinchi, S. (2011). WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(6), 704–711.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.9327>
- Hu, Y., Tan, C., Lin, X., Lai, Z., Zhang, X., Lu, Q., Feng, N., Yang, D., & Weng, L. (2019). Exonuclease III-regulated target cyclic amplification-based single nucleotide polymorphism detection using ultrathin ternary chalcogenide nanosheets. *Frontiers in Chemistry*, *7*, 844. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00844>
- Miranda, C., Roco, Á., Garay, J., Squicciarini, V., Tamayo, E., Agúndez, J., García-Martin, E., Sasso, J., Saavedra, I., Cáceres, D., & Quiñones, L. (2011). Determinación del polimorfismo de CYP2C9*2 y su relación con la farmacocinética de acenocumarol en voluntarios sanos. *Revista Chilena de Cardiología*, *30*(3), 225–232.
<https://doi.org/10.4067/s0718-85602011000300005>
- Muley, V. Y., & Pathania, A. (2017). Gene expression. En *Springer eBooks* (pp. 1–6).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_49-2

- Naranjo, M. G., Rodrigues-Soares, F., Peñas-Lledó, E. M., Tarazona-Santos, E., Fariñas, H., Rodeiro, I., Terán, E., Grazina, M., Moya, G. E., López-López, M., Sarmiento, A. P., Calzadilla, L. R., Ramírez-Roa, R., Ortiz-López, R., Estévez-Carrizo, F. E., Sosa-Macías, M., Barrantes, R., Llerena, A., & Moya, G. E. (2018). Interethnic variability in *CYP2D6*, *CYP2C9*, and *CYP2C19* genes and predicted drug metabolism phenotypes among 6060 Ibero- and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium report on population pharmacogenomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 22(9), 575–588. <https://doi.org/10.1089/omi.2018.0114>
- Naujokaitis, D., Asmoniene, V., & Kadusevicius, E. (2021). Cytochrome P450 2C19 enzyme, Cytochrome P450 2C9 enzyme, and Cytochrome P450 2D6 enzyme allelic variants and its possible effect on drug metabolism: A retrospective study. *Medicine*, 100(11), e24545. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024545>
- Ndadza, A., Muyambo, S., Mntla, P., Wonkam, A., Chimusa, E., Kengne, A. P., Ntsekhe, M., & Dandara, C. (2021). Profiling of warfarin pharmacokinetics-associated genetic variants: Black Africans portray unique genetic markers important for an African-specific warfarin pharmacogenetics-dosing algorithm. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(12), 2957–2973. <https://doi.org/10.1111/jth.15494>
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766–2770. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2766>
- Pour, A. F., Pietrzak, M., Sucheston-Campbell, L. E., Karaesmen, E., Dalton, L. A., & Rempala, G. A. (2020). High dimensional model representation of log likelihood

ratio: Binary classification with SNP data. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 7.

<https://doi.org/10.1186/s12920-020-00774-1>

Pratt, V. M., Cavallari, L. H., Del Tredici, A. L., Hachad, H., Ji, Y., Moyer, A. M., Scott, S.

A., Whirl-Carrillo, M., & Weck, K. E. (2019). Recommendations for clinical

CYP2C9 genotyping allele selection: A joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *Journal of Molecular*

Diagnostics, 21(5), 746–755. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.04.003>

Puig, L. (2023). Raza y ascendencia: una breve revisión y una propuesta de clasificación

consistente en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 114(10), 847–849.

<https://doi.org/10.1016/j.ad.2023.07.013>

Ramírez, B., Niño-Orrego, M. J., Cárdenas, D., Ariza, K. E., Quintero, K., Contreras Bravo,

N. C., Tamayo-Agudelo, C., González, M. A., Laissue, P., & Fonseca Mendoza, D. J.

(2019). Copy number variation profiling in pharmacogenetics CYP-450 and GST genes in Colombian population. *BMC Medical Genomics*, 12(1), 168.

<https://doi.org/10.1186/s12920-019-0556-x>

Rodríguez, A. (2020). Variantes *2 y *3 del gen CYP2C9 e hipertensión arterial en una

muestra de casos y controles peruanos [Tesis de licenciatura, Universidad San Martín de Porres]. Repositorio USMP.

[https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7850/rodriguez_cae.pdf](https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7850/rodriguez_cae.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[f?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7850/rodriguez_cae.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Rodrigues-Soares, F., Peñas-Lledó, E. M., Tarazona-Santos, E., Sosa-Macías, M., Terán, E.,

López-López, M., Rodeiro, I., Moya, G. E., Calzadilla, L. R., Ramírez-Roa, R.,

Grazina, M., Estévez-Carrizo, F. E., Barrantes, R., & Llerena, A. (2019). Genomic

- ancestry, *CYP2D6*, *CYP2C9*, and *CYP2C19* among Latin Americans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(1), 257–268. <https://doi.org/10.1002/cpt.159>
- Ruano, G., Villagra, D., & Carracedo, A. (2019). Population-specific pharmacogenomics: The case for implementing precision medicine in Latin America. *Pharmacogenomics Journal*, 19(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0049-7>
- Sanguhl, K., Claudio-Campos, K., Cavallari, L. H., Agúndez, J. A. G., Whirl-Carrillo, M., Duconge, J., Del Tredici, A. L., Wadelius, M., Rodrigues Botton, M., Woodahl, E. L., Scott, S. A., Klein, T. E., Pratt, V. M., Daly, A. K., & Gaedigk, A. (2021). PharmVar GeneFocus: *CYP2C9*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 110(3), 652–672. <https://doi.org/10.1002/cpt.2333>
- Sausville, L. N., Gangadhariah, M. H., Chiusa, M., Mei, S., Wei, S., Zent, R., Luther, J. M., Shuey, M. M., Capdevila, J. H., Falck, J. R., Guengerich, F. P., Williams, S. M., & Pozzi, A. (2018). The cytochrome P450 slow metabolizers *CYP2C92* and *CYP2C93* directly regulate tumorigenesis via reduced epoxyeicosatrienoic acid production. *Cancer Research*, 78(17), 4865–4877. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3977>
- Stubbins, M. J., Harries, L. W., Smith, G., Tarbit, M. H., & Wolf, C. R. (1996). Genetic analysis of the human cytochrome P450 *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics*, 6(5), 429–439. <https://doi.org/10.1097/00008571-199610000-00007>
- Susman, M. (2001). Genes: Definition and structure. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001494>

- Valencia, A. E., Chevarría Arriaga, M., Coelho, E. B., Sandoval, J. S., & Granara, A. S. (2021). Metabolizer phenotype prediction in different Peruvian ethnic groups through CYP2C9 polymorphisms. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 36(2), 115–124. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2020-0146>
- Vicente, J., González-Andrade, F., Soriano, A., Fanlo, A., Martínez-Jarreta, B., & Sinués, B. (2014). Genetic polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 in Ecuadorian Mestizo and Spaniard populations: A comparative study. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1359–1368. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2971-y>
- Vidović, S., Škrbić, R., Stojiljković, M. P., Vidović, V., Bećarević, J., Stoisavljević-Šatara, S., & Maksimović, N. (2021). Prevalence of five pharmacologically most important CYP2C9 and CYP2C19 allelic variants in the population from the Republic of Srpska in Bosnia and Herzegovina. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 72(2), 119–126. <https://doi.org/10.2478/aiht-2021-72-3499>
- Xiong, L. L., Xue, L. L., Al-Hawwas, M., Huang, J., Niu, R. Z., Tan, Y. X., Xu, Y., Su, Y. Y., Liu, J., & Wang, T. H. (2020). Single-nucleotide polymorphism screening and RNA sequencing of key messenger RNAs associated with neonatal hypoxic-ischemia brain damage. *Neural Regeneration Research*, 15(1), 98–107. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264469>
- Yoon, Y. R., Shon, J. H., Kim, M. K., Lim, Y. C., Lee, H. R., Park, J. Y., Cha, I. J., & Shin, J. G. (2001). Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51(3), 277–280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.00340.x>

Zhou, Y., Nevosadová, L., Eliasson, E., & Lauschke, V. M. (2023). Global distribution of functionally important CYP2C9 alleles and their inferred metabolic consequences. *Human Genomics*, 17(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40246-023-00461-z>

Zhu, H., & Zhou, X. (2020). Statistical methods for SNP heritability estimation and partition: A review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1550–1562. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.011>

VIII. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudiante de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Gallo lo invitamos a participar de manera voluntaria y anónima en un proyecto de investigación cuyo objetivo es determinar la frecuencia de mutaciones con importancia en el metabolismo de fármacos en estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en el periodo 2023-2024, el cual no pondrá en riesgo su salud. Este documento contiene la información necesaria que te ayudará a aclarar tus dudas para que así puedas decidir participar en este estudio.

1. Si usted firma el consentimiento está autorizando a que se le tome una muestra de sangre para poder conocer si usted es portador de algunas de las mutaciones del interés de este estudio, la muestra será procesada en los laboratorios de la facultad de Biología de la UNPRG.
2. No se expone a ningún riesgo al brindarnos su muestra de sangre, no hay ningún costo, no hay ningún beneficio hacia su persona, ni subvención económica y sus datos serán tratado de manera anónima, se recalca que la información obtenida formará parte de una base de datos que será de ayuda en futuras investigaciones.
3. Si usted tiene alguna duda puede comunicarse con nosotros a los números: 930221343 jvelasuezb@unprg.edu.pe Jahayra Velasquez Bances, 9201361188 cpuescass@unprg.edu.pe Christian Puescas Sánchez.
4. Usted al firmar este consentimiento reconoce que ha leído este documento, ha preguntado y ha tenido respuestas a sus dudas, su participación es voluntaria y recibirá una copia firmada de este documento.

Nombre completo del participante

Firma del participante

Nombre completo del investigador

Firma del investigador

Fecha

Figura 10.

Visualización del producto de PCR en gel de agarosa al 1%.

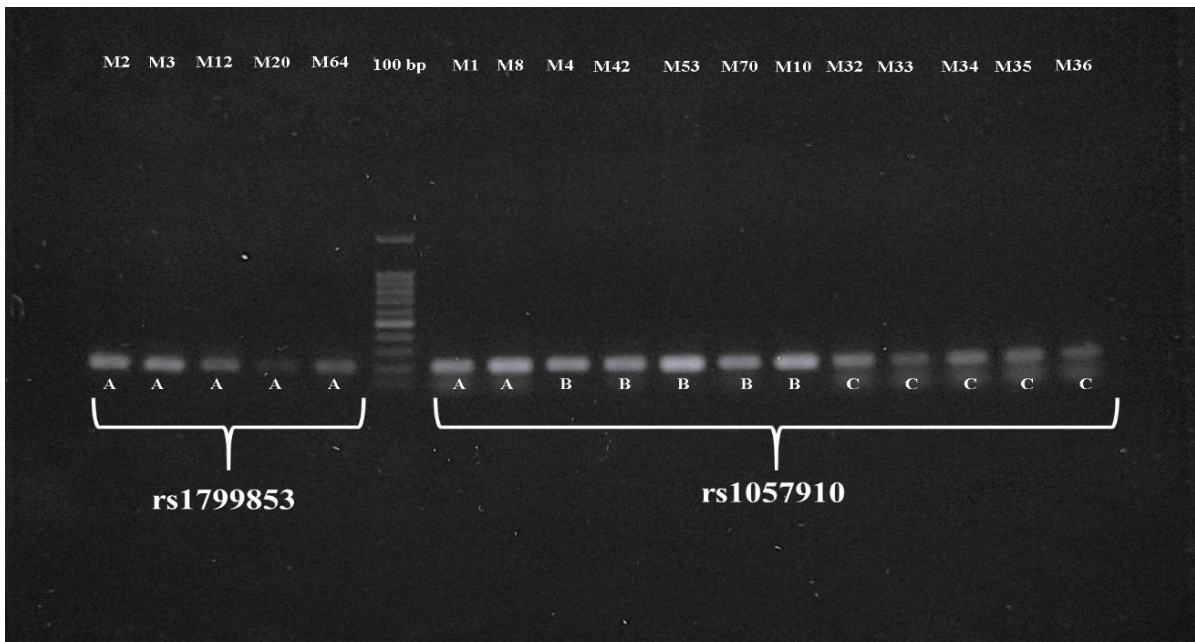


Figura 12.

*Análisis del SNP rs79001894 G/A/C/T Alelo *8 del Gen CYP2C9 desde la plataforma GeneBrowser*

