

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN
REGIONES EXÓNICAS DEL GEN *CYP2D6***

NATALI QUINTERO GARRIDO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2016**

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN
REGIONES EXÓNICAS DEL GEN *CYP2D6***

NATALI QUINTERO GARRIDO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TITULO DE
PREGADO EN: QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**TUTOR:
ANDRÉS CASTILLO**

**COTUTOR:
LEONEL MONTEALEGRE**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2016**

CONTENIDO

Resumen	7
Abstract.....	8
1. introducción.....	9
2. Descripción del proyecto.....	10
2.1 Planteamiento del problema.....	10
2.2 Marco teórico.....	11
2.2.1 Polimorfismos	11
2.2.2 Métodos para determinar SNPs.....	12
2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
2.2.4 Enzima CYP2D6.....	17
2.2.4 Almacenamiento de muestras de sangre.....	18
2.3 Objetivos	20
2.4 Metodología Utilizada.....	21
2.4.1 Toma de muestras	21
2.4.2 Extracción de ADN de sangre almacenada en tarjetas FTA.....	21
2.4.3 Estandarización de la amplificación de un fragmento del exón 9 del gen <i>CYP2D6</i>	22
2.4.4 Metodología de purificación de bandas	23
2.4.5 Secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada.....	24
2.4.6 Análisis de las secuencias de ADN	25
2.5 Resultados	26
2.5.1 Extracción del ADN.....	26
2.5.2 Amplificación de un fragmento del exón 9 del gen <i>CYP2D6</i>	27
2.5.3 Secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada	27
2.5.4 Análisis de la secuencias de ADN	28
2.6 Discusión.....	30
2.7 Conclusión.....	32
2.8 Recomendaciones.....	33
2.9 Perspectivas.....	34
3. Bibliografía	35
4. Anexos	38
Anexo 1. Aval ético de la Universidad Icesi y la Fundación Valle del Lili.....	38

Anexo 2. Protocolo de realización de la PCR con los primers PCO3/PCO4 para el gen de β -globina.	42
Anexo 3. Protocolo de preparación de gel de agarosa al 2%	42
Anexo 4. Protocolo purificación de bandas.....	43
Anexo 5. Secuencias de ADN.....	44

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Polimorfismo SNP	12
Figura 2. Método de secuenciación “didesoxi” de Sanger..	14
Figura 3. Método de secuenciación automatizado..	15
Figura 4. Esquema de una PCR	17
Figura 5. Prueba de calidad del ADN mediante la amplificación del gen de la beta-globina con los cebadores PCO3/PCO4.....	26
Figura 6. Gel de agarosa de muestras de extracción de ADN de tarjetas FTA.....	27
Figura 7. Alineamiento realizado con el servidor clustal Omega entre las secuencia obtenidas de la muestra 5 y 8 en el laboratorio (SEC5LBM; SEC8LBM) y por servicio técnico (SEC5; SEC8)	28
Figura 8. Análisis de alineamiento de las secuencias realizado con el programa clustal omega de un fragmento del exón 9 del gen CYP2D6	28

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Sustratos farmacológicos de la enzima CYP2D6	18
Tabla 2. Reactivos utilizados para preparación del mix PCR	22
Tabla 3. Reactivos utilizados para preparación del la reacción de secuenciación.....	25
Tabla 4. Absorbancia del Amplicon del gen CYP2D6 después de la purificación de bandas.....	27
Tabla 5. SNPs identificados en las secuencias obtenidas de un fragmento del exón 9 del gen <i>CYP2D6</i>	29

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribunucleico
CYP2D6	Enzima CYP2D6
<i>CYP2D6</i>	Gen CYP2D6
dNTPs	Desoxinuclótidos
ddNTPs	Didesoxi-nucleótidos
mL	Mili litros
mg	Miligramos
mm	milimetro
ng	nanogramo
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SNPs	Polimorfismos de nucleotido simple
μL	micro litro

RESUMEN

Este es un estudio que busca identificar Polimorfismos de Nucleótido simples (SNPs) del gen *CYP2D6* por medio de secuenciación “didesoxi” de Sanger automatizada. Para realizar el estudio se tuvieron muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA, lo que implica una metodología para extraer el ADN de este medio de almacenamiento; estas muestras fueron tomadas por punción cutánea. Este gen es de gran importancia ya que codifica a la enzima CYP2D6 que hace parte de la súper familia de enzimas del citocromo P450 y se encarga del 20-25% del metabolismo de fármacos. Este gen posee nueve exones y es altamente polimórfico, lo que produce cambios fenotípicos en la enzima.

Como objetivo se tiene identificar SNPs presentes en el gen *CYP2D6* por medio de la técnica de secuenciación “didesoxi” de Sanger automatizada; para la realización de esta técnica se estandarizo la reacción de secuenciación. Además se estandarizo una reacción de amplificación con un cebador que amplifica una región de 332pb en el exón 9 del gen. Por ultimo se analizo la secuencia obtenida en busca de polimorfismos y se encontraron 2 SNPs sinónimos y 6 no sinónimos.

Palabras claves: Polimorfismos de nucleótido simple (SNP); gen *CYP2D6*, estandarización, secuenciación “didesoxi” de Sanger automatizada, tarjetas FTA.

ABSTRACT

This is a study that looks to identify Simple Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of CYP2D6 gene by Sanger automated "didesoxy" sequencing. For the study, blood samples were stored on FTA cards, which involves a methodology to extract DNA from the storage medium; these samples were taken by skin prick. This gene has great importance since encoding the enzyme CYP2D6 that is part of the super family of cytochrome P450 enzymes and is responsible of 20-25% of drug metabolism. This gene has nine exons and is highly polymorphic, which produces phenotypic changes in the enzyme.

The target is to identify SNPs present in the CYP2D6 gene by Sanger automated "didesoxy" sequencing technique; for the realization of this technique the sequencing reaction was standardized. In addition a reaction of amplification with a primer which amplifies a region of 332pb in exon 9 of gene was standardized. Finally the sequence obtained was analyzed for polymorphisms; 2 SNPs synonyms and 6 SNPs not synonyms were found.

Keywords: Simple Nucleotide Polymorphisms (SNP); CYP2D6 gene, standardization, Sanger automated "didesoxy" sequencing technique, FTA cards.

1. INTRODUCCIÓN

En el presente estudio se estandarizó una metodología que permitió la secuenciación de un fragmento 332pb del exón 9 del gen *CYP2D6*, con el fin de identificar variantes polimórficas de nucleótido simple (SNP = siglas en inglés) por análisis de alineamiento con el programa BLAST del NCBI.

El gen *CYP2D6* codifica una enzima asociada con el 20 al 25% del metabolismo hepático de xenobióticos. El gen consiste en nueve exones altamente polimórficos (Ingelman-Sundberg, Sim, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007 2007). De los cuales, algunos SNPs se han relacionado con diferentes tipos de fenotipos metabolizadores de fármacos (Martinez de Dueñas et al., 2014).

Para que una de estas variaciones se considere un SNP debe ocurrir en al menos el 1 % de la población humana. Teniendo en cuenta que el genoma humano son unos 3 billones de bases está claro que el conjunto de SNPs caracteriza a cada individuo de forma que puede darnos una idea de sus características en cuanto a propensión a enfermedades. Algunos SNPs están localizados en zonas que codifican proteínas y otros en zonas no codificantes. Muchos SNPs no tienen efecto sobre la función de la célula pero otros podrían influir en la predisposición a enfermedades y en la respuesta a bacterias, virus o toxinas y en la respuesta a diferentes drogas y tratamientos. Esto hace que los SNPs tengan un gran valor en medicina pudiendo ser útiles en la prevención, en el diagnóstico y en el tratamiento de muchas enfermedades. Además al ser estables, conservándose durante muchas generaciones, permiten hacer estudios de poblaciones.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adecuación de un tratamiento farmacológico se hace teniendo en cuenta los factores de edad, sexo y algunas condiciones especiales (personas en embarazo, lactancia, adultos mayores); pero en diferentes estudios realizados se ha determinado que estos no son los únicos factores que pueden influir en la farmacoterapia (Zhang, Zhang, Ling, & Jia, 2015), lo que plantea el problema de poder identificar otros posibles factores que afecten la respuesta terapéutica; entre estos, los factores genéticos. Esta dificultad se ve reflejada en los pacientes que son tratadas con medicamentos cuya dosis recomendada no produce los efectos esperados e incluso les genera eventos adversos, generando una falla terapéutica que produce un incremento en el costo en salud y una disminución de la eficacia de tratamientos farmacológicos. En el suroccidente colombiano, la información de SNPs presentes en enzimas de la súper-familia del citocromo P450, las cuales metabolizan el 80% de xenobióticos, es limitada o nula, en especial, la enzima CYP2D6 que se relaciona con el 20 al 25% del metabolismo de los fármacos. Por lo tanto, para la identificación de los SNPs presentes en el gen *CYP2D6*, se plantea en el presente estudio estandarizar la tecnología de secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada de ADN.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Polimorfismos

Los individuos de una misma especie comparten características que son otorgadas por secuencias de ADN. Aproximadamente el 99% de esta información es muy similar, pero no igual (Feero, Guttmacher, & Collins, 2010). Se considera que hay un polimorfismo genético cuando existen múltiples alelos de un gen en una población definida o, de manera más específica, cuando la secuencia de bases nitrogenadas de la molécula de ADN de un *locus* en particular es variable entre los organismos de una población. Un polimorfismo puede observarse en un individuo completo (polimorfismo fenotípico), en formas variables de proteínas o grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico), en las características morfológicas de los cromosomas (polimorfismo cromosómico) o en el ADN, por diferencias en la secuencia nucleotídica (polimorfismos del ADN) (Gómez Meda, Zamora Pérez, & Sánchez Parada, 2013).

Los polimorfismos, como las mutaciones, pueden clasificarse de acuerdo con su efecto en polimorfismos sinónimos o silentes (los que no cambian la traducción del producto proteico o secuencia de aminoácidos; esto es, los que, cuando la secuencia nucleotídica cambia, el codón que codificaba al aminoácido original se cambia por otro que codifica para el mismo aminoácido o por otro con características químicas similares); y polimorfismos no sinónimos (los que sí producen variación en la lectura del código genético, por alterar codones que cambian el sentido de la traducción de un aminoácido por otro). Además, se considera que los polimorfismos neutros, que son los que varían en su secuencia en regiones no codificables del ADN, también son silentes. La presencia de un polimorfismo de ADN en una población puede determinar respuestas diferenciales a estímulos medioambientales y con el paso del tiempo, podría llegar a presentarse en un alto porcentaje de una población e incluso ser tan común como un alelo silvestre según la zona geográfica en la que habita (Gómez Meda, Zamora Pérez, et al., 2013). Usualmente cuando la presencia de una variante en el ADN se encuentra en más del 1% en una población, se considera como polimorfismo (Herráez Sánchez, 2012b)

Los polimorfismos se utilizan como marcadores genéticos para identificar o relacionar a personas, ya que al ser heredables, generalmente sin cambios de padres a hijos, permiten establecer parentescos biológicos directos (marcadores moleculares). Para poder llevar a cabo estos estudios de marcadores, en primer lugar hay que definir los tipos de polimorfismos genéticos, ya que pueden clasificarse de acuerdo con diferencias de estructura, forma de transmisión, distribución, estabilidad, tamaño. Dado a que los métodos de estudio e

identificación de polimorfismos son diversos y cada opción tiene ventajas y desventajas, la utilización de varios tipos de polimorfismos que aporten diferente información sobre su herencia e individualidad permite obtener resultados más amplios y útiles para una interpretación adecuada.

Existen diferentes tipos de polimorfismos, que se pueden organizar en dos grupos generales: los que involucran cambios o polimorfismos en un solo nucleótido (SNP, siglas en inglés), y en los que intervienen deleciones o inserciones de pocos o muchos pares de bases. Los SNPs pueden presentarse por la deleción, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica (ver figura 1). Este tipo de polimorfismo es muy frecuente, y muchas enfermedades se han relacionado con la presencia de SNPs, tales como enfermedades cardiovasculares, o metabopatías (Checa Caratachea, 2007; Shen, Tian, Ran, & Gao, 2015). Por esta razón se realizan investigaciones para identificar SNPs como bio-marcadores que puedan usarse en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

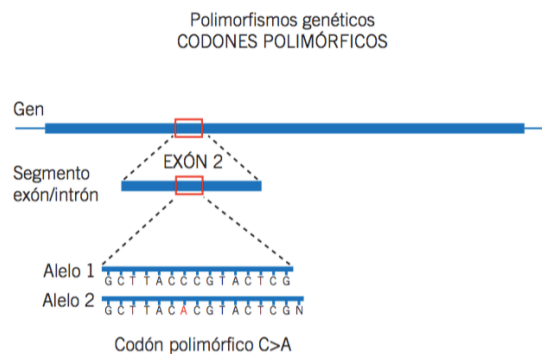


Figura 1. Polimorfismo SNP. Representa el cambio de una base de citosina por una adenina tomado de (Gómez Meda, Zamora Pérez, et al., 2013).

2.2.2 Métodos para determinar SNPs

La asociación de SNPs con algunas enfermedades ha llevado a la búsqueda de diferentes métodos para identificarlos. Entre ellos se encuentran los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas del en ingles), la secuenciación “didesoxi” de Sanger y la secuenciación automatizada, entre otros.

Los RFLPs fueron uno de los primeros métodos para la detección de polimorfismos. Esta técnica se basa en la detección de variaciones en el sitio diana de enzimas de restricción, que cortan fragmentos específicos del ADN. Cuando el cambio de un nucleótido altera la secuencia diana para una

determinada enzima de restricción, puede detectarse el polimorfismo en función de la variación que éste genera en el patrón de restricción. (Gómez Meda, Zamora Pérez, et al., 2013).

Estas diferencias de fragmentos se detectan mediante una corrida electroforética de estas muestras después de la reacción con las enzimas de restricción. Sin embargo, esta técnica es útil solamente cuando el SNPs se encuentra en la diana de las enzimas de restricción, por lo que los polimorfismos presentes en otras secuencias no se pueden detectar. Por esta razón, este método no es recomendado para identificar SNPs nuevos (Gómez Meda, Zamora Pérez, et al., 2013) (Checa Caratachea, 2007).

Para ello se emplean otras técnicas que determinan de modo directo la secuencia del ADN. Una de ellas es la secuenciación “didesoxi” de Sanger, desarrollada en la década de los 70s por Frederick Sanger. La principal característica de este método de secuenciación es el uso de didesoxi- nucleótidos (ddNTPs), análogos estructurales de los desoxinucleótidos (dNTPs), pero que provocan la detención de la reacción de síntesis de DNA. Por ello, el método se conoce también como secuenciación de terminación de cadena. Dado que se emplea una DNA polimerasa para sintetizar hebras complementarias a la que se quiere secuenciar, otra característica del método es la necesidad de un cebador, un oligonucleótido diseñado para que se hibride con el extremo 3' de la región que se quiere secuenciar (Walker & Lorsch, 2013). Las reacciones se llevan a cabo en cuatro tubos, cada uno conteniendo los cuatro tipos de dNTPs, DNA polimerasa y uno de los tipos de ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP o ddCTP). La adición de los ddNTPs produce que se detenga la síntesis de la molécula generando fragmentos de diferente tamaño que se identifican utilizando electroforesis. El tamaño de cada molécula indica la posición del ddNTP responsable de la interrupción de la síntesis dentro de la secuencia (ver figura 2) (Herráez Sánchez, 2012c). La visualización de los fragmentos después de la corrida de electroforesis se realiza mediante autorradiografía cuando se utiliza marcaje radiactivo de los ddNTPs ó, más comúnmente en la actualidad, mediante marcas quimioluminiscentes (fluorescentes), para evitar el manejo de radiactividad (Gómez Meda, Zuñiga Gonzáles , Vera Cruz, & Álvarez Rodríguez, 2013)

Algunas dificultades que se presentan con el método de secuenciación “didesoxi” de Sanger incluyen la baja calidad de las primeras 15 a 40 bases de la secuencia, debido a la unión de los cebadores; y el deterioro de las últimas bases (entre las posiciones 700- a 900). Por esta razón, es poco recomendable realizar la secuenciación de fragmentos de ADN menores a 300pb o mayores a 800pb con este método .

El avance de la tecnología ha permitido la automatización de este método, en el cual, los ddNTPs marcados con fluorocromos de cuatro colores distintos son leídos por medio de sistemas ópticos que los detectan a medida que avanzan por el polímero de electroforesis, logrando un método menos tóxico, directo, fácil y rápido (ver figura 3). Este método involucra a un robot para realizar las reacciones del método “didesoxi” para evitar errores humanos por pipeteo. (Allison, 2007) (Gómez Meda, Zuñiga Gonzáles , et al., 2013)

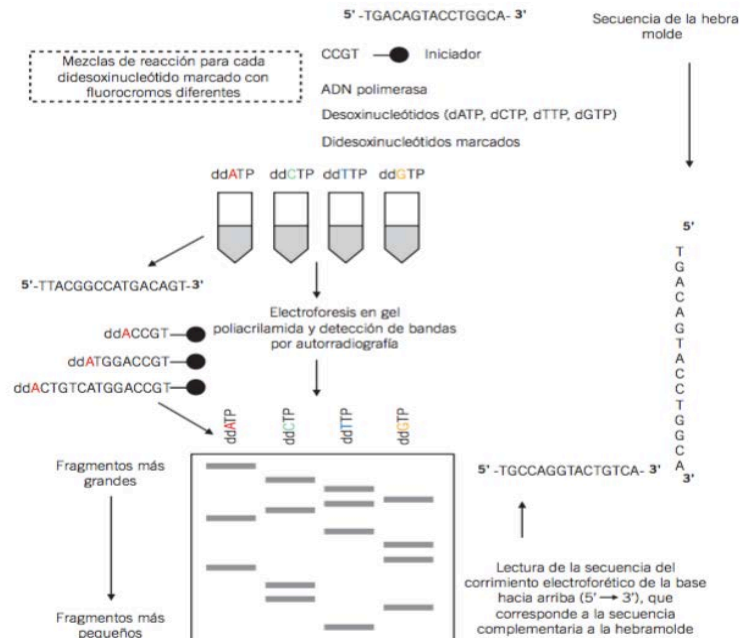


Figura 2. Método de secuenciación “didesoxi” de Sanger. Representa como se lleva a cabo este método de secuenciación tomado de (Gómez Meda, Zuñiga Gonzáles , et al., 2013).

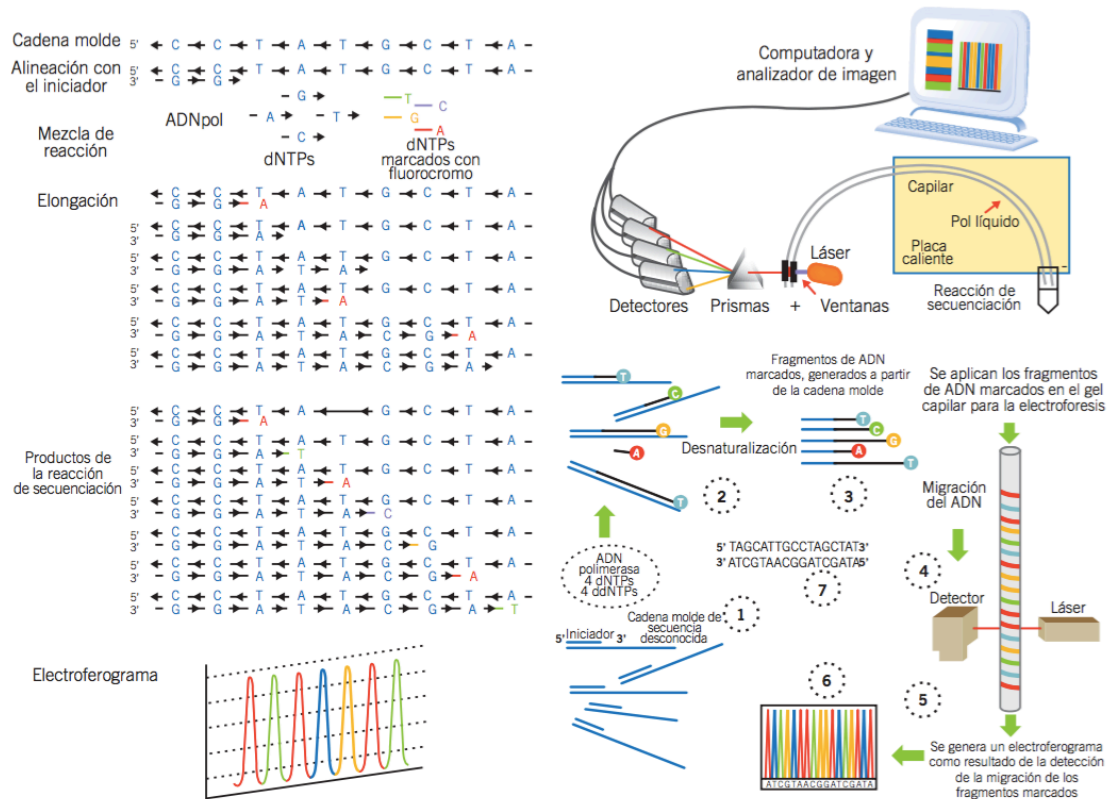


Figura 3. Método de secuenciación automatizado. Representa la secuenciación automatizada basada en la secuenciación “didesoxi” de Sanger. En esta figura se puede observar como los números los pasos que se requieren para llevarse a cabo y como es detectado el producto final en un computador (Gómez Meda, Zuñiga González , et al., 2013).

2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este método fue desarrollado en 1986 por el Doctor Kary Mullis, el cual le significó el premio Nobel de Química en 1993 . Esta técnica permite la amplificación de una secuencia específica de ADN mediante nucleótidos trifosfatados y una ADN polimerasa. La longitud de la secuencia a amplificar la definen los cebadores (también llamados iniciadores ó primers en inglés), los cuales son secuencias específicas de nucleótidos diseñadas para ser complementarias a la región a amplificar; idealmente no deberían formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones con otras regiones de las cadenas de ADN (Sandoval Rodríguez, Floresvillar Mosqueda, & Meza Ríos)

La amplificación *in vitro* de la PCR sigue las reglas de la replicación natural: cada hebra de una secuencia de ADN genómico es utilizada como molde y por complementariedad se sintetiza la cadena antiparalela. Además, la síntesis

también tiene dirección 5'-3', ya que la adición de cada nucleótido se lleva a cabo por el extremo 3' de la cadena que se forma (la cual aporta un grupo OH libre), con un oxígeno del grupo fosfato del nucleótido a adicionar, para generar así la formación de un enlace fosfodiéster (Sandoval Rodríguez et al.).

Por otro lado, la principal diferencia de la PCR con la replicación se encuentra en el uso de la temperatura (en vez de enzimas), para desnaturalizar y así poder abrir el ADN en dos hebras; con el fin de permitir la entrada de los cebadores (anillamiento), y la formación de la nueva cadena por medio de ADN polimerasas termoestables (inicialmente descubiertas y aisladas de microorganismos termófilos como *Thermophilus aquaticus*) (Chen et al., 2015). De esta manera, simultáneamente con la técnica de PCR, se diseñó un equipo capaz de realizar ciclos precisos de temperaturas que permitiera la desnaturalización de las hebras de ADN (aproximadamente a 95°C), el anillamiento de los cebadores a entre 55 y 65°C, y la extensión de la ADN polimerasa termoestable (normalmente a 72°C) (Ver figura 4). Este equipo en la actualidad recibe el nombre de Termociclador (Sandoval Rodríguez et al.).

Adicionalmente, para realizar la PCR se requiere de magnesio como cofactor para el funcionamiento de la enzima ADN polimerasa; una solución amortiguadora que proporcione el pH y la concentración de sales adecuadas para las reacciones; los cuatro tipos de desoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), para la síntesis de las nuevas hebras de ADN y; los cebadores que se unan al extremo 3' de la región diana en ambas cadenas (Herráez Sánchez, 2012a; Sandoval Rodríguez et al.)

La PCR tiene múltiples aplicaciones, como la identificación de individuos a partir de muestras de sangre o saliva (utilizada en ciencia forense) y la secuenciación de genes de todo tipo de organismos. Además, a partir de la PCR convencional se han desarrollado otras técnicas de mayor especificidad como la PCR cuantitativa, conocida también como PCR en tiempo real. Además, la PCR convirtió en una rutina la secuenciación génica y permitió la lectura completa del genoma humano, así como la de muchos organismos que se toman como modelos de problemas biológicos en la investigación.

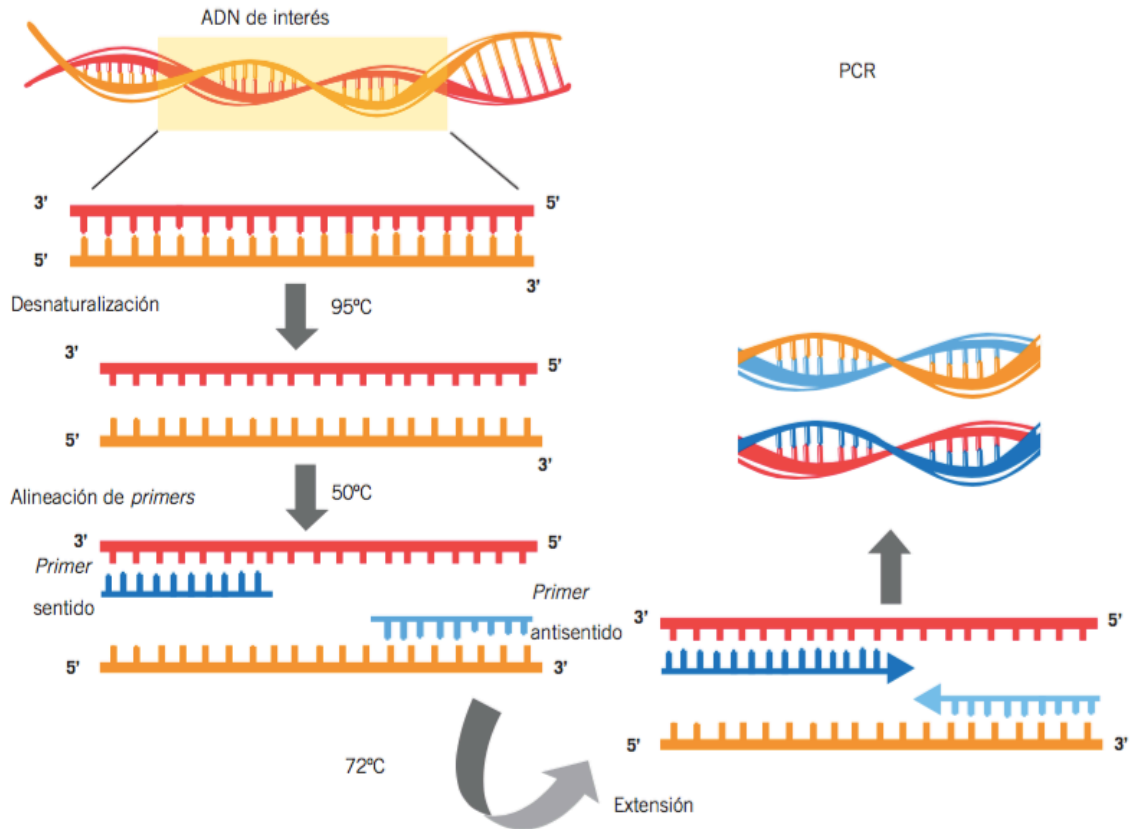


Figura 4. Esquema de una PCR. En esta figura se muestran los pasos para una PCR convencional. Estos pasos están compuestos por una desnaturalización, una anillamiento o alineamiento de cebador (primers) y un paso de extensión. Tomado de (Sandoval Rodríguez et al., 2013)

2.2.4 Enzima CYP2D6

La enzima CYP2D6 hace parte del citocromo P450, que es una súper-familia de enzimas encargadas de gran parte del metabolismo hepático de primer paso. Esta súper-familia metaboliza cerca del 70% de las sustancias endógenas y exógenas, entre ellas fármacos. Las enzimas más importantes en la biotransformación pertenecientes al citocromo son la CYP3A4 con un 50% del metabolismo y la CYP2D6 que metaboliza cerca de 20-25% de fármacos (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Los humanos contamos con aproximadamente 57 genes que codifican para las diferentes isoformas del citocromo; cabe resaltar que estos genes presentan un elevado número de polimorfismos lo que puede resultar en un metabolismo pobre afectando la farmacoterapia (de Groot, Wakenhut, Whitlock, & Hyland, 2009)

La enzima CYP2D6 se encarga del metabolismo de agentes anti-arrítmicos, derivados de la morfina, antagonistas de los receptores- β , algunos antidepresivos y antipsicóticos, entre otros como se muestra en la tabla 1 (Jin et al., 2013). Esta enzima es codificada por el gen *CYP2D6* el cual posee un número elevado de SNPs y tiene el locus en el cromosoma 22q13.1; se caracteriza por ser multi-alelico. *CYP2D6* cuenta con nueve exones; con un marco de lectura abierto de 1386pb codificando 461 aminoácidos (Varela, Quiñones, Stojanova, & Garay, 2015). Se han descrito más de 63 variantes funcionales diferentes de este gen, describiendo los alelos implicados y el cambio en la acción enzimática en la data base CYPalleles.ki.se (Sim, 2015).

Tabla 1. Sustratos farmacológicos de la enzima CYP2D6

Sustratos	Oncológicos	Tamoxifeno, Imantinib
	Antipsicóticos	Risperidona
	Antiarrítmicos	Encainida
	Antidepresivo	Clomipramina
	Antiarrítmicos	Lidocaína
	B-Bloqueador	Carvedilol, metoprolol
	Opiáceos	Tramadol
	Otros	Ondasetron, Metoclopramida

El alto número de polimorfismos afecta la actividad enzimática, debido a la variación estructural que tiene la enzima por estos SNPs. Se han caracterizado según el tipo de metabolizador diferentes tipos de enzimas de CYP2D6, entre ellas esta las de metabolismo pobre (PM), intermedio o funcional (IM), rápido (Gómez Meda, Zuñiga González, et al.), ultra-rápido (UM) o extensivo (EM), estas diferencias de metabolizadores se dan dependiendo en genotipo expresado, por lo tanto depende directamente de los SNPs que presente en los alelos (Falzoi, Pani, Pira, & Lazzari, 2012) (Antonio Gallego Fernández, 2011)

2.2.4 Almacenamiento de muestras de sangre

Para el análisis de la estructura genómica de un individuo la molécula de interés es el ADN genómico que se encuentra en el núcleo de las células. Todas las células nucleadas de un individuo poseen el mismo genoma, cuya información normalmente no se ve afectada por la edad ni por variables metabólicas. Por ello, la muestra para estudiar la estructura genómica de un individuo puede ser cualquier célula nucleada. Sin embargo, hay que elegir la muestra que involucre el procedimiento menos invasivo y la menor cantidad de riesgos e incomodidad para el paciente (García Bañuelos, Bastidas Ramirez, Gordillo Bastidas, & Gordillo Bastidas, 2013). De esta manera, las muestras de sangre, que desde mucho

tiempo son usadas para determinar factores que indican el estado de salud y la homeostasis de un paciente como los niveles de triglicéridos, hemoglobina, glucosa, entre otros; también son la elección más frecuente como fuente directa de ADN genómico para realizar estudios genéticos como los de identificación de polimorfismos, mutaciones, etc.

Las muestras de sangre pueden tomarse de diferentes maneras, dependiendo de la cantidad necesaria para el estudio. Comúnmente, para la realización de análisis genéticos de un individuo, la muestra de elección es sangre periférica mediante punción venosa. Estas muestras contienen diversos tipos celulares en las que solamente los leucocitos poseen núcleo, y por ende, ADN. No obstante, se trata de un método invasivo y que puede representar incomodidad, particularmente para niños y adultos mayores. Además, requiere que su procesamiento sea oportuno para evitar la degradación del material genético o almacenar a corto plazo en nevera o a mediano plazo en congeladores, en ocasiones con adición de soluciones de preservación.

Las tarjetas Flinders Technology Associates (FTA) se diseñaron para el almacenamiento de muestras de sangre en seco para la extracción de material genético. Básicamente se trata de un papel filtro que ha sido tratado previamente con sustancias químicas que rompen las células, desnaturalizan las proteínas y estabilizan los ácidos nucleicos (Liang, Chigerwe, Hietala, & Crossley, 2014). El ADN queda atrapado en la matriz de fibra de estas tarjetas y es protegido contra nucleasas, la oxidación o daños producidos por radiación UV. Sus principales ventajas es que no requieren refrigeración y ocupan un espacio mínimo de almacenamiento, lo que las hace muy útiles para transportar cuando se hacen tomas de muestra por fuera del laboratorio. Además, sólo se necesitan unas cuantas gotas de sangre que pueden ser obtenidas a partir de una punción digital, lo cual representa menos incomodidad para el paciente que la venopunción.

Se ha mostrado que el ADN almacenado en tarjetas FTA se conserva apto por varios años (Wong, Lim, & Tan-Siew, 2012), principalmente para estudios que las emplean para el diagnóstico de enfermedades virales mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés). No obstante, pocos han estudios evaluado este método de almacenamiento a partir del cual se pueda extraer ADN apto para realizar estudios de polimorfismos mediante secuenciación por el método “didesoxi” de Sanger. Además, sólo se necesitan unas cuantas gotas de sangre que pueden ser obtenidas a partir de una punción digital, lo cual representa menos incomodidad para el paciente que la venopunción. Incluso, se han realizado estudios a partir de ADN extraído de muestras de saliva y células de la mucosa oral almacenadas en tarjetas FTA.

2.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarización de una metodológica para la identificación de SNPs de ADN en regiones exónicas del gen *CYP2D6*, en muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA, mediante la secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada.

Objetivos específicos

1. Estandarización de las condiciones de la técnica de PCR para la amplificación de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6* a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA.
2. Estandarización de las condiciones de la técnica de secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada para la obtención de las secuencias nucleotídicas de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*.
3. Identificación de SNPs de ADN por análisis de alineamiento de secuencias de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*.

2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1 Toma de muestras

Las muestras analizadas en el presente estudio fueron tomadas del banco de muestras de sangre del proyecto “Respuesta al tamoxifeno y su relación con la fármaco-genética y variantes polimórficas del gen *CYP2D6* en pacientes con cáncer de mama” con acta aprobación ética # 033 del comité de ética humana de la universidad Icesi y el acta de aprobación #10 del comité de ética en investigación Biomédica de la Fundación Valle del Lili (Anexo 1). La toma de muestras de sangre la realizó un profesional de salud competente para llevar a cabo el procedimiento. Se realizó una punción cutánea en el dedo índice donde se extrae máximo 3 gotas de sangre y se almaceno en tarjetas FTA. La sangre fue tomada de pacientes que estén recibiendo tratamiento de quimioterapia en la Fundación Valle del Lili.

2.4.2 Extracción de ADN de sangre almacenada en tarjetas FTA

La extracción de ADN de muestras de sangre se realizó a partir de uno y dos discos de 4mm de diámetro de tarjetas FTA™ Micro Card (Whatman™) rotulados M1 y M2 respectivamente. Los discos fueron obtenidos con una máquina perforadora para un solo hueco. Además, se extrajo el ADN de tres discos que posteriormente fueron cortados en trozo más pequeños rotulando la muestra como M3. Los discos y fragmentos de las tarjetas FTA fueron depositados en tubos eppendorf de 1,5 ml con ayuda de pinzas estériles.

Los materiales empleados para la obtención de los discos y fragmentos de las tarjetas FTA fueron lavados en hipoclorito por dos minutos, seguido de dos enjuagues sucesivos en etanol al 70%. Posteriormente, se esterilizo todo el material con un mechero de alcohol. Por último, el material fue limpiado y colocado sobre un papel filtro nuevo a temperatura ambiente cada vez que se utilizó. El anterior procedimiento se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad para evitar contaminación cruzada entre las muestras.

Para la extracción de ADN de los cortes de las tarjetas FTA se utilizó el kit QIAmp® DNA mini (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante con ciertas modificaciones. En resumen, los trozos de las tarjetas fueron incubados a 56°C por una hora con agitación en vortex cada 5 minutos para la extracción del ADN en soluciones de lisis con proteinasa K, la cual se usó para la degradación de las proteínas. Luego se agregó etanol absoluto (Sigma-Aldrich) para la precipitación del ADN con agitación en vortex.

Una de las modificaciones al protocolo del fabricante fue transferir el contenido total final del tubo eppendorf a la columna del kit que atrapa al ADN (QIAamp Mini spin, QIAGEN) que contenía los trozos de los fragmentos de FTA, además, se modificó la velocidad y el tiempo de centrifugación en los lavados, donde la velocidad máxima fue de 13400 rpm por cinco minutos. Posteriormente, se realizó el proceso de obtención del ADN de la columna con 35µL del buffer de elución por cinco minutos dos veces, tiempo mayor al sugerido por el kit, obteniendo al final un volumen de 70µL. Al terminar el proceso de extracción de ADN, se midió la concentración y limpieza del ADN extraído en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-2000c (Thermo Scientific®).

Además, se realizó una prueba de calidad del ADN mediante la amplificación del gen de la *beta-globina* con los cebadores PCO3/PCO4 (Saiki, Gelfand, & Stoffel, 1988). Las condiciones de amplificación del gen *beta-globina* se describen en el anexo 2.

2.4.3 Estandarización de la amplificación de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*

Para la estandarización de la técnica de la PCR de amplificación de ADN para el fragmento de 332bp del exón 9 del gen *CYP2D6* se utilizó la pareja de cebadores PAC0013 (Falzoi, Pira, & Pani, 2013). La secuencias de los cebadores son: P13F: 5'-CCA CTC TCA CCC TGC ATC T-3' y P13R: 5'-AGC TCA TAG GGG GAT GGG-3'. Para determinar la temperatura de anillamiento (T_m = siglas en inglés) de los cebadores para la PCR se realizó un análisis de gradiente programado en el termociclador (ESCO). Las temperaturas incluyeron: 55,0°C; 55,2°C; 55,7°C; 56,5°C; 57,6°C; 59,0°C; 60,7°C; 62,2°C; 63,3°C; 64,2°C; 64,7°C; y 65°C. Las concentraciones y volúmenes usados de los reactivos de la PCR se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos utilizados para preparación del mix PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µL)
H ₂ O	-	-	13,3
Buffer	5x	1x	5
DNTPs	5mM	0,2mM	1
P ₁ (P13f)	10µM	0,5mM	1,25
P ₂ (P13r)	10µM	0,5mM	1,25
MgCl ₂	25mM	2mM	2
Taq	5u/rea	1u/rea	0,2
DNA	-	-	1
Volumen total (µL)			25

Los amplificadores obtenidos en la PCR por cada Tm fueron separados en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 1X en una cámara para electroforesis *Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis System*, a 110 V por 30 minutos. El método de la preparación del gel de agarosa se reporta en el anexo 3. Los amplificadores se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador UV del Sistema DigiDoc-It™ (UVP®). El tamaño de las bandas en el gel fueron determinadas con una escalera de ADN (*Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Ready-to-Use 100 to 1000bp*). Las condiciones del programa de amplificación fueron las siguientes: una temperatura inicial del 95°C por 4 minutos, seguido de 40 de ciclos de amplificación a una temperatura de desnaturalización de 95°C por 15 segundos, anillamiento desde 55,2°C a 65°C por 45 segundos y extensión de 72°C por 1 minuto y finalmente una extensión a 72°C por 7 minutos

2.4.4 Metodología de purificación de bandas

Para la purificación de la banda, la electroforesis se realizó como se describió anteriormente con la diferencia que se llevó a cabo en agarosa de bajo punto de fusión al 2%. Para lograr la solidificación del gel se dejó a 4°C por 10 minutos. A partir de este gel se cortaron las bandas de cada muestra correspondientes a 332pb con ayuda del sistema de foto documentación y cuchillas de bisturí estériles. Cada fragmento del gel con la banda del amplificado se depositó en un tubo eppendorf de 1,5ml. Para realizar la purificación de las bandas se utilizó el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). El procedimiento se describe en el anexo 4. En resumen, el protocolo consistió en fundir el gel de agarosa para liberar al ADN junto con la adición de una solución de unión a membrana e incubación a 65°C. Al producto de la incubación se le realizó vortex y se dejó a temperatura ambiente para que la agarosa precipitara. Los pasos para purificar el ADN fueron los siguientes: adición de una solución de lavado de membrana y centrifugación a máxima velocidad por dos veces. El producto de la centrifugación fue transferido a una columna y se centrifugó a máxima velocidad. Posteriormente se descartó el producto de la filtración y se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1,5mL a la que se realizó una centrifugación a máxima velocidad teniendo la tapa del tubo eppendorf abierta. Por último, se adicionó agua libre de nucleasas a la columna dejándola a temperatura ambiente, seguida de una centrifugación; en este paso se guarda el filtrado y se desecha la columna. Para asegurar la purificación de las bandas se realizó la medición de absorbancia por medio del espectrofotómetro (Nanodrop®).

2.4.5 SECUENCIACIÓN “DIDESOXI” DE SANGER AUTOMATIZADA

El proceso de secuenciación del exón 9 del gen *CYP2D6* se realizó en dos muestras en seis pasos en el secuenciador de ADN 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del laboratorio de Biomedicina III de la Universidad Icesi. Primero se prepara la secuencia de interés de la reacción de secuencia. Esto consiste en la amplificación de la misma vía PCR. Una vez culminado el PCR la secuencia debe ser limpiada para eliminar los restos de primer y posibles inhibidores de la reacción de secuencia. El segundo paso es la cuantificación del producto de PCR limpio. La reacción de secuencia es muy sensible a la concentración del ADN templado, grandes cantidades inhiben la reacción (los reactivos se consumen rápidamente, como resultado se obtienen secuencias truncadas) y las pequeñas cantidades generan intensidades de luz pequeñas que pueden ser confundidas con el ruido de fondo. Adicionalmente se tiene establecida la cantidad de ADN templado para varios tipos y tamaños de secuencias.

El tercer paso es la reacción de secuencia. Esta consiste en el copiado de la secuencia patrón, no es una amplificación de la secuencia como en el caso de la PCR, de allí que la concentración del ADN inicial sea tan restrictiva. La reacción de secuencia necesita de la hebra molde, uno solo de los primers, una enzima polimerasa de ADN, el cofactor de la enzima $MgCl_2$, una solución tampón (buffer), los cuatro desoxinucleotidos (dNTPs) y los cuatro didesoxinucleotidos marcados (ddNTPs). El kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) de secuenciación trae una solución con la mezcla adecuada de dNTPs, ddNTPs, la enzima y el $MgCl_2$. Los reactivos utilizados para preparación de la reacción de secuenciación se describen en la Tabla 3. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a $98^{\circ}C$ por un minuto y de $96^{\circ}C$ por 10 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación con una temperatura de desnaturalización $96^{\circ}C$ por 10 segundos, anillamiento a $50^{\circ}C$ por 5 segundos y alineamiento $60^{\circ}C$ por 4 minutos.

Tabla 3. Reactivos utilizados para preparación del la reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen por reacción (µL)
BDT	2,5X	2
Buffer	5x	1
Amplificado	-	1
P₁ (P13f)	10pM	0,4
Agua MilliQ	-	5,6
	Total	10

BDT: BigDye® X Terminator™, P: primer

El cuarto paso es la precipitación de la reacción de secuencia. En este se eliminan los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir en la lectura del secuenciador. El quinto paso es la resuspensión de la secuencia marcada en formamida de alta pureza (Formamida Hi-Di). Finalmente el último paso consiste en el montaje de la muestra en el equipo de secuenciación. El procedimiento de secuenciación se realizó también por servicio técnico con la empresa Corpogen, lo cual sirvió para comparar resultados y la calidad de la secuencia obtenida.

2.4.6 Análisis de las secuencias de ADN

Para el análisis de las secuencias de ADN se realizó una búsqueda por alineamiento con secuencias ya reportadas por otros investigadores con el programa BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las variaciones en las secuencias de nucleótidos no sinónimas que afectaban la estructura primaria de la proteína CYP2D6 eran corroboradas con el electroferograma obtenido del secuenciador.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Extracción del ADN

La concentración del ADN de la muestra M3, la cual fue extraída de sangre a partir de trozos de tres discos de 4 mm de las tarjetas FTA fue de 14,1 ng/μL con una pureza de $A_{260}/A_{280} = 1,79$. Para el ADN de la muestra M2, que se extrajo a partir de dos discos de 4 mm de tarjetas FTA sin cortar en trozos, la concentración fue 2,7 ng/μL con una pureza $A_{260}/A_{280} = 1,77$; y para la muestra M1, la concentración del ADN extraído a partir de un solo disco de 4 mm fue 2,6 ng/μL con una pureza $A_{260}/A_{280} = 1,3$.

Los resultados de la electroforesis de los productos amplificados de la PCR para el gen de la *beta-globina* al comparan las tres metodologías de extracción del ADN mostro que la muestra M3 presento la mejor banda de amplificación, es decir, con una mayor intensidad al compararse con las muestras M2 y M1, como se observa en la figura 5.

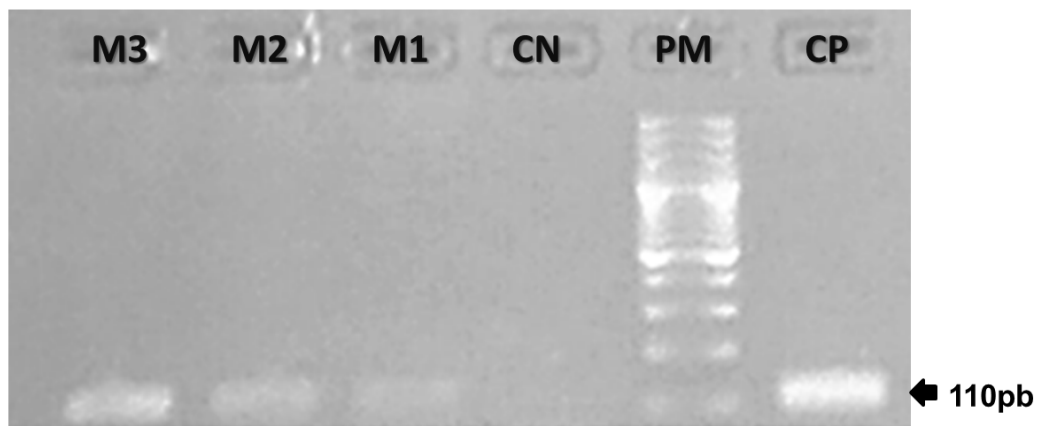


Figura 5. Prueba de calidad del ADN mediante la amplificación del gen de la beta--globina con los cebadores PCO3/PCO4. M3: muestra con trozos de tarjetas FTA a partir de tres discos de 4 mm; M2: muestra con dos discos de 4 mm de tarjetas FTA; M1: Muestra con un disco 4 mm de tarjetas; CN: control negativo; PM: Peso Molecular; CP: control positivo.

2.5.2 Amplificación de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*

Se amplificó en 8 muestras de ADN un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*. Los resultados de la electroforesis se observan en la figura 6.

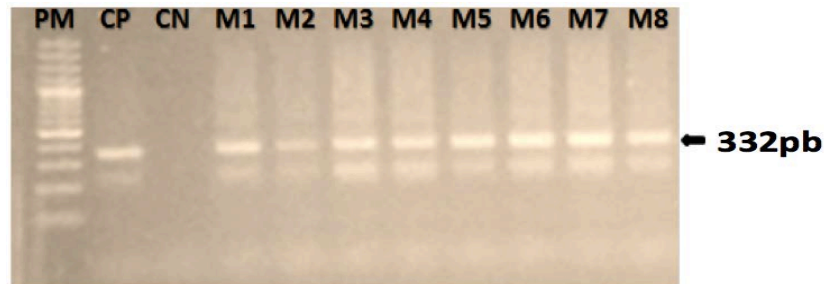


Figura 6. Gel de agarosa de muestras de extracción de ADN de tarjetas FTA. PM: peso molecular; CP: control positivo; CN: control negativo; M1-M8: muestras

A cada amplificado del gen *CYP2D6* se le procedió a medir su concentración y pureza, los resultados se encuentran consignados en la tabla 4.

Tabla 4. Absorbancia del Amplicon del gen *CYP2D6* después de la purificación de bandas.

Muestras	Concentración del ADN (ng/uL)	Pureza A_{260}/A_{280}
Blanco	0	-0,01
1	5	1,5
2	4,7	1,37
3	5,8	1,54
4	6,1	1,5
5	6	1,56
6	6,7	1,44
7	6,1	1,49
8	6,2	1,35

2.5.3 Secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada

Las secuencias de ADN del exón 9 del gen *CYP2D6* de las muestras 5 y 8 obtenidas en el equipo de secuenciación del laboratorio de Biomedicina III de la Universidad Icesi se compararon con los resultados obtenidos por servicio técnico utilizando el programa clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El porcentaje de identidad entre las secuencias de la muestra 5 y 8 obtenida en el laboratorio y la obtenida por servicio técnico en ambos casos fue mayor del 99%, figura 7.

SEC5	GTCTTTGCTTTCCTGGTGAACCCATCCCCATAGCTTTGTGCTGTGCCCGCTAGAAT	SEC8LBM	GTCTTTGCTTTCCTGGTGAACCCATCCCCATAGCTTTGTGCTGTGCCCGCTAGAAT
SEC5LBM	GTCTTTGCTTTCCTGGTGAACCCATCCCCATAGCTTTGTGCTGTGCCCGCTAGAAT	SEC8	GTCTTTGCTTTCCTGGTGAACCCATCCCCATAGCTTTGTGCTGTGCCCGCTAGAAT
SEC5	GGGGTACCTAGTCCCAGCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATG	SEC8LBM	GGGGTACCTAGTCCCAGCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATG
SEC5LBM	GGGGTACCTAGTCCCAGCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATG	SEC8	GGGGTACCTAGTCCCAGCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATG
SEC5	TGGTAGTCCAACCTCGGGTCCCCTGCTCACGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCA	SEC8LBM	TGGTAGTCCAACCTCGGGTCCCCTGCTCACGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCA
SEC5LBM	TGGTAGTCCAACCTCGGGTCCCCTGCTCACGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCA	SEC8	TGGTAGTCCAACCTCGGGTCCCCTGCTCACGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCA
SEC5	ACCCACCCCTGCTCATTCTGCTTACCCACCGCTGCCGCAATTTGAGACAGGGTA	SEC8LBM	ACCCACCCCTGCTCATTCTGCTTACCCACCGCTGCCGCAATTTGAGACAGGG
SEC5LBM	ACCCACCCCTGCTCATTCTGCTTACCCACCGCTGCCGCAATTTGAGACAGGGTA	SEC8	ACCCACCCCTGCTCATTCTGCTTACCCACCGCTGCCGCAATTTGAGACAGGG
SEC5	CGTTGA		
SEC5LBM	CGTTGA		

Figura 7. Alineamiento realizado con el servidor clustal Omega entre las secuencia obtenidas de la muestra 5 y 8 en el laboratorio (SEC5LBM; SEC8LBM) y por servicio técnico (SEC5; SEC8). A=adenina; C= citosina; G= guanina; T= timina; Y= citosina o timina; S= guanina o citosina; *= igual

2.5.4 Análisis de la secuencias de ADN

En total se analizaron 8 secuencias de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6* por servicio técnico y 2 en el laboratorio de biomedicina III de la universidad Icesi, las cuales se comparan con la secuencia del gen *CYP2D6* (JF307778.1). En la figura 8 se observa los alineamientos de las secuencias obtenidas.

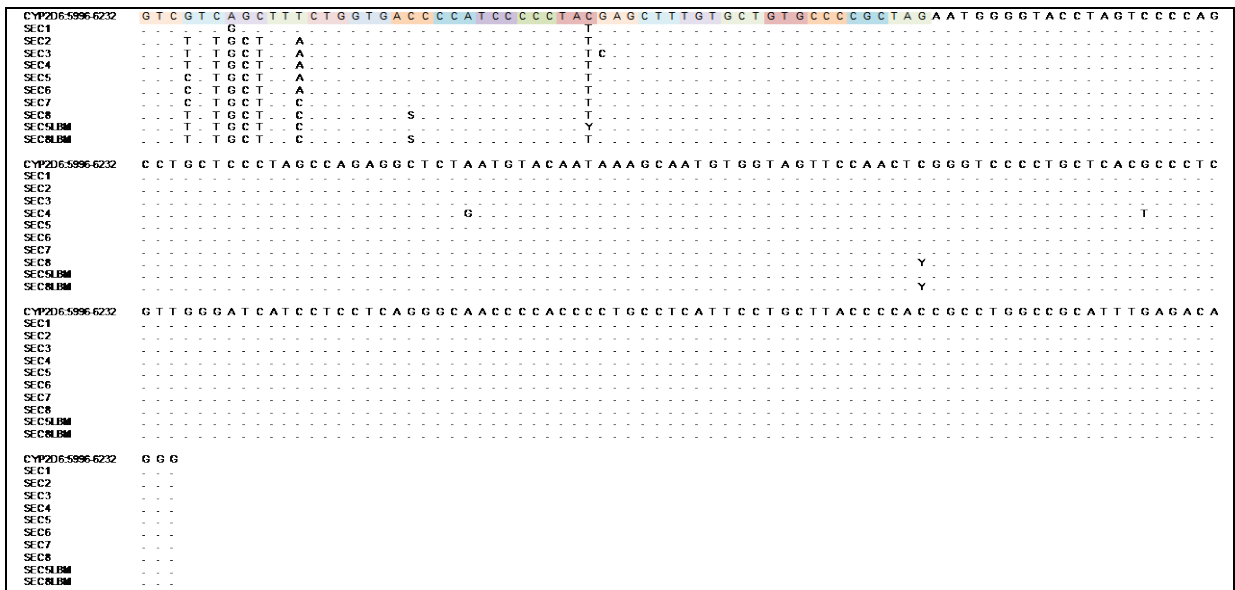


Figura 8. Análisis de alineamiento de las secuencias realizado con el programa clustal omega de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*. Los colores indican los codones finales del exón 9, la región sin color corresponde a la región 3'UTR de la proteína. Las secuencias SEC5LBM y SEC8LBM fueron obtenidas en el laboratorio de BioMedicina III de la Universidad Icesi.

En la tabla 5 se observan los SNPs obtenidos al comparar las secuencias del estudio con la secuencia CYP2D6 (JF307778.1) previamente publicada en el banco de genes-NCBI. Para la muestra SEC1 se encontró un SNP no sinónimo en la posición 482 generando un cambio en el aminoácido serina (S) por una glicina (G). En la muestra SEC2 se identificaron 3 SNPs no sinónimos en las posiciones: 481 (valina por fenilalanina); 482 (serina por alanina); y 483 (fenilalanina por leucina). Para la muestra SEC3 se obtuvieron 4 SNPs no sinónimos en las posiciones: 481 (valina por fenilalanina); 482 (serina por alanina); 483 (fenilalanina por leucina); y 491 (ácido glutámico por glutamina). En la muestra SEC4 se identificaron 3 SNPs no sinónimos en las posiciones: 481 (valina por leucina); 482 (serina por alanina); y 483 (fenilalanina por leucina). Para la muestra SEC5 y 6 se obtuvieron 3 SNPs no sinónimos en las posiciones: 481 (valina por leucina); 482 (serina por alanina); y 483 (fenilalanina por leucina). En las muestras SEC7 y 8 se obtuvo un SNP no sinónimo en la posición 482 (serina por alanina). SNPs sinónimos se obtuvieron en la posición 490 en todas las muestras y en la posición 483 para las muestras SEC 7 y 8.

Tabla 5. SNPs identificados en las secuencias obtenidas de un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6*

MUESTRA	CAMBIO ALELICO	POSICION EN LA PROTEINA	CAMBIO DEL AMINOACIDO	TIPO DE SNP
SEC3	GAG - CAG	491	E(Glu) - Q(Gln)	No Sinonimo
Todas	TAC - TAT	490	Y(Tyr) - Y(Tyr)	Sinonimo
SEC2 - 6	TTT - TTA	483	F(Phe) - L(Leu)	No Sinonimo
SEC7 - 8	TTT - TTC	483	F(Phe) - F(Phe)	Sinonimo
SEC1	AGC - GGC	482	S(Ser) - G(Gly)	No Sinonimo
SEC2 - 8	AGC - GCT	482	S(Ser) - A(Ala)	No Sinonimo
SEC2,3,8	GTC - TTT	481	V(Val) - F(Phe)	No Sinonimo
SEC4 - 7	GTC - CTT	481	V(Val) - L(Leu)	No Sinonimo

2.6 DISCUSIÓN

Este es un estudio que busca identificar SNPs en un fragmento del exón 9 del gen *CYP2D6* por medio de secuenciación “didesoxi” de Sanger automatizada. Para realizar el estudio se tuvieron muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA, lo que implica una metodología para extraer el ADN de este medio de almacenamiento; estas muestras fueron tomadas por punción cutánea. Este gen es de gran importancia ya que codifica a la enzima CYP2D6 que hace parte de la súper familia de enzimas del citocromo P450 y se encarga del 20-25% del metabolismo de fármacos.

Pocos estudios han evaluado el método de almacenamiento de sangre en tarjetas FTA para estudios de polimorfismos tipo SNP mediante secuenciación por el método “didesoxi” de Sanger. En esta metodología sólo se necesitan unas cuantas gotas de sangre que pueden ser obtenidas a partir de una punción digital, lo cual representa menos incomodidad para el paciente que la venopunción.

Para la extracción de ADN de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA se realizó varias pruebas en donde se modificaron algunos pasos del protocolo original sugerido por los fabricantes del kit QIAmp® DNA mini (QIAGEN®) utilizado en el estudio. Como se observa en la figura 5, la extracción de ADN a partir de trozos de tarjetas FTA (muestra M3) se observó una mejor intensidad de banda en comparación con las muestras M1 y M2. El anterior resultado se puede explicar debido a que la muestra M3 presentó una mayor concentración de ADN (14,7ng/µL) que las muestras M1 y M2 en el proceso de extracción del ADN, además de un nivel alto de pureza ($A_{260}/A_{280} = 1,79$).

Al comparar la secuenciación de dos de las muestras analizadas con el secuenciador del laboratorio de Biomedicina III de la Universidad Icesi con las obtenidas por servicio técnico, se encontró una similitud mayor al 99% entre ambas secuencias, las principales diferencias se debieron por problemas en el electroferograma, ya que al equipo no definir si en una misma posición la señal corresponde a una citosina o una timina, el programa colocaba la letra Y que significa pirimidinas, (figura 7 y 8), igual ocurrió en la posición indicada como S, lo que significa que puede ser guanina o citosina.

En el presente estudio también se encontraron dificultades, con el método de secuenciación “didesoxi” de Sanger utilizado para determinar las primeras bases de la secuencia directa por la baja calidad, esto posiblemente debido a la unión de los cebadores; como también en la baja señal para las últimas bases. Por esta razón, es poco recomendable realizar secuenciación directa sin repeticiones o de fragmentos de ADN menores a 300pb o mayores a 800pb.

En el análisis de los SNP fueron identificados dos sinónimos y seis no sinónimos (Tabla 4). Los SNPs sinónimos no cambian la traducción del producto proteico o secuencia de aminoácidos; esto es, los que, cuando la secuencia nucleotídica cambia, el codón que codificaba al aminoácido original se cambia por otro que codifica para el mismo aminoácido, como fue el caso para los aminoácidos de las posiciones 483 y 490 (Tabla 4) y SNPs no sinónimos son los que sí producen variación en la lectura del código genético ya que alterar los codones y se cambia el sentido de la traducción de un aminoácido por otro.

Así, en el presente estudio se logro estandarizar un método para la identificación de SNP a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA del gen *CYP2D6*, por medio de la tecnología de secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada de ADN.

2.7 CONCLUSIÓN

- En el presente estudio se logro estandarizar un método para la identificación de SNP a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA del gen *CYP2D6*, por medio de la tecnología de secuenciación "didesoxi" de Sanger automatizada de ADN.
- En las secuencias obtenidas del laboratorio de biomedicina III y las secuenciadas por servicio técnico se encontró una similitud del 99% entre ellas.
- Se identificaron 8 SNPs de los cuales 2 son sinónimos y 6 no sinónimos.

2.8 RECOMENDACIONES

- No realizar una amplificación de las muestras de ADN extraídas antes de secuenciarlas y se es necesario limpiarlas para eliminar todo el contenido de componentes que puedan afectar la secuenciación; también se debe tener en cuenta la cantidad de bases G-C que tiene la región que se desea secuenciar.
- Usar dos metodologías de extracción y comparar los resultados obtenidos para poder tener una mejor precisión al tener repeticiones de los datos obtenidos.

2.9 PERSPECTIVAS

- Con el presente trabajo de grado se logro estandarizar una metodología que permitirá secuenciar las demás regiones exónicas del gen *CYP2D6* para la identificación de SNPs como biomarcadores de pronóstico.
- El laboratorio III de biomedicina de la universidad Icesi podrá ofrecer servicios de secuenciación a la comunidad académica y clínica del sur-occidente colombiano.

3. BIBLIOGRAFÍA

Allison, L. A. (2007). Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Fundamental Molecular Biology* (1 ed., Vol. 1, pp. 180-231). Williamsburg: Wiley-Blackwell.

Antonio Gallego Fernández, M. A. S. G. A. M. M. F. S. B. R. M. J. G. G. (2011). *Aspectos fundamentales del Citocromo P450*: ADEMÁS.

Checa Caratachea, M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Revista instituto nacional de enfermedades respiratorias ismael cosío villegas*, 20, 213-221.

Chen, S., Zheng, X., Cao, H., Jiang, L., Liu, F., & Sun, X. (2015). A simple and efficient method for extraction of Taq DNA polymerase. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(5), 355-358. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.08.001>

de Groot, M. J., Wakenhut, F., Whitlock, G., & Hyland, R. (2009). Understanding CYP2D6 interactions. *Drug Discovery Today*, 14(19–20), 964-972. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.005>

Falzoj, M., Pani, L., Pira, L., & Lazzari, P. (2012). Analysis of CYP2D6 allele frequencies and identification of novel SNPs and sequence variations in sardinians. *Genetics*, 2013, 1-10.

Feero, W. G., Guttmacher, A. E., & Collins, F. S. (2010). Genomic Medicine — An Updated Primer. *New England Journal of Medicine*, 362(21), 2001-2011. doi:[doi:10.1056/NEJMra0907175](https://doi.org/10.1056/NEJMra0907175)

García Bañuelos, J. J., Bastidas Ramirez, B. E., Gordillo Bastidas, E., & Gordillo Bastidas, D. (2013). Manejo de muestras para estudios moleculares. In A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez, & J. Armendáriz Borunda (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (Primera ed., pp. 93-98). México: McGraw Hill education.

Gómez Meda, B. C., Zamora Pérez, A. L., & Sánchez Parada, M. G. (2013). Polimorfismos de ADN y huella genética. In A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez, & J. Borunda Armendáriz (Eds.), *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (Vol. 1, pp. 171-180). México: McGraw Hill education.

Gómez Meda, B. C., Zuñiga Gonzáles , G. M., Vera Cruz, J. M., & Álvarez Rodríguez, B. A. (2013). Secuecnciación del ADN y microarreglos. In A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez, & A. Borunda. (Eds.), *Biología molecular. Fundmaentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (Vol. 1, pp. 160-170). México: MacGraw-Hill education.

Herráez Sánchez, Á. (2012a). Clonación acelular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *Texto ilustrativo e interactivo de biología molecular e ingeniería genética* (Segunda ed., pp. 201-209). Barcelona, España: Elseiver.

Herráez Sánchez, Á. (2012b). Diversidad del genoma: polimorfismos *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética*. (segunda ed., pp. 405 - 429). Barcelona, España: Elseiver.

Herráez Sánchez, Á. (2012c). Estructura y función de los RNA *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética* (Segunda ed., pp. 61-78). Barcelona, España.: Elsiwier.

Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 496-526.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>

Jin, T.-B., Ma, L.-F., Zhang, J.-Y., Yuan, D.-Y., Sun, Q., Zong, T.-Y., . . . Chen, C. (2013). Polymorphisms and phenotypic analysis of cytochrome P450 2D6 in the Tibetan population. *Gene*, 527(1), 360-365.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.110>

Liang, X., Chigerwe, M., Hietala, S. K., & Crossley, B. M. (2014). Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Virological Methods*, 202, 69-72.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.022>

Martinez de Dueñas, E., Ochoa Aranda, E., Blancas Lopez-Barajas, I., Ferrer Magdalena, T., Bandrés Moya, F., Chicharro García, L. M., . . . Olmos Antón, S. (2014). Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *The Breast*, 23(4), 400-406.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2014.02.008>

Sandoval Rodríguez, A. S., Floresvillar Mosqueda, J. F., & Meza Ríos, A. (2013). Reacción en cadena de la polimerasa. In A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval

Rodríguez, & J. Borunda Armendáriz (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en la ciencias de la salud* (pp. 145-159): McGraw-Hill education.

Shen, W., Tian, Y., Ran, T., & Gao, Z. (2015). Genotyping and quantification techniques for single-nucleotide polymorphisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 1-13. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.008>

Sim, S. C. (2015). CYP2D6 allele nomenclature.

Walker, S. E., & Lorsch, J. (2013). Chapter Fourteen - Sanger Dideoxy Sequencing of DNA. In L. Jon (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 529, pp. 171-184): Academic Press.

Wong, H. Y., Lim, E. S. S., & Tan-Siew, W. F. (2012). Amplification volume reduction on DNA database samples using FTA™ Classic Cards. *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 176-179. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.008>

Zhang, G., Zhang, Y., Ling, Y., & Jia, J. (2015). Web Resources for Pharmacogenomics. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), 51-54. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.002>

4. ANEXOS

Anexo 1. Aval ético de la Universidad Icesi y la Fundación Valle del Lili



Acta de Aprobación N° 033

Proyecto:

“RESPUESTA AL TAMOXIFENO Y SU RELACIÓN CON LA FARMACOGENÉTICA Y VARIANTES POLIMÓRFICAS DEL GEN CYP2D6 EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA”

Sometido por:

Andrés O. Castillo G

El Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi, creado mediante la Resolución de Rectoría No. 763 del 13 de Abril del 2010, se rige por la Resolución 008430 del 04 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Resumen del Proyecto | <input checked="" type="checkbox"/> Protocolo de Investigación |
| <input checked="" type="checkbox"/> Formato de consentimiento informado | <input type="checkbox"/> Instrumento de recolección de datos |
| <input type="checkbox"/> Folleto del investigador (si aplica) | <input type="checkbox"/> Carta de instrucciones a participantes |
| <input checked="" type="checkbox"/> Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente Clasificación de Riesgo:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sin Riesgo | <input checked="" type="checkbox"/> Riesgo Mínimo | <input type="checkbox"/> Riesgo Mayor del Mínimo |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|

4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada
6. Este proyecto será revisado nuevamente en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o se las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio
7. Informará inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. Informará inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos humanos.
Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas
 - b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité
9. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados
10. El investigador principal deberá informar al Comité
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrá iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario (a) y al presidente.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes
 - e. Cualquier decisión tomada por otros comités de ética
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:



Fecha:

08

05

2015

Nombre: Yoseth Ariza-Araujo

Teléfono: 5552334 ext. 8140

Capacidad representativa: Presidente del Comité de Ética Humana

**CARTA DE APROBACION COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION BIOMEDICA IRB/EC
No. 155 - 2015**

Santiago de Cali, 04 Mayo de 2015

**DOCTORA:
LILIANA FERNANDEZ TRUJILLO
INVESTIGADOR PRINCIPAL
FUNDACIÓN VALLE DEL LILI**

El Comité de Ética en investigación Biomédica de la Fundación Valle del Lili recibió el 28 Abril de 2015 para aprobación, Protocolo No. 829 "Respuesta al Tamoxifeno y su relación con la Farmacogenética y variantes polimórficas del gen cyp2d6 en pacientes con cáncer de mama"

Como se registra en el ACTA No. 10 del 04 Mayo de 2015.

Se realizó evaluación de manera: **Regular y por Consenso.**

- Protocolo del estudio Versión 1.0 – VP-CYP2D6
- Investigador Principal: Dra. Liliana Fernández Trujillo
- Co- Investigadores: Dr. Juan Guillermo Restrepo, Dr. Andrés Orlando Castillo Giraldo, Dra. Luz Fernanda Sua Villegas, Dra. Laura María Díaz Correa, Dr. Fernando Rosso.
- Coordinador: Dr. Carlos Andrés Muñoz.
- Las hojas de vida del grupo investigador con sus soportes y certificados del NIH han sido aprobadas por este comité en la misma reunión.

APROBADO SIN MODIFICACIONES

Acuso de Recibido:

- Formulario de Protocolo No. 829.
- Carta de Aprobación del Centro de Investigaciones Clínicas.

El nombre de La Institución en donde se desarrollará este estudio es la FUNDACIÓN VALLE DEL LILI

Número de miembros del Comité de Ética en Investigación Biomédica: 7

Número de miembros para que haya quórum: 4

Miembros que participaron en esta aprobación: 6

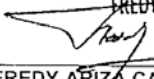
Dr. FREDY ARIZA	Presidente, Epidemiólogo, Anestesiólogo Fundación Valle del Lili
Dr. JORGE VELÁSQUEZ	Vicepresidente, representante del área médica, Cardiólogo intervencionista FVL
Dr. JAIME MANUEL RESTREPO	Representante del área médica, Nefrólogo Pediatra Fundación Valle del Lili.
Dra. PATRICIA GARCÉS	Representante de la comunidad, Trabajadora Social
Dra. MARÍA GRACIELA HOYOS	Representante área no médica, Psicóloga, Maestría en filosofía
Sr. GIOVANI NARANJO	Representante del área no medica, Químico Farmacéutico.

La Vigencia de los miembros: 20 de Junio del 2013 a 20 Junio del 2015

"Este comité se ciñe a las regulaciones nacionales e internacionales: Resolución 2378, Resolución 8430, Decreto 1543, Declaración de Helsinki, Declaración Universal de los Derechos Humanos, Reporte Belmont, Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos, Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales, Conferencia Internacional de Armonización (ICH), como se encuentra reglamentado en nuestros estatutos".

Lo invitamos a que revise el documento **OBLIGACIONES DEL INVESTIGADOR** disponible en nuestra página web www.clinicavalle.org. Circular No. 002 del 2014. Es muy importante que revise el documento para garantizar un adecuado desarrollo en su investigación.

Atentamente,


FUNDACIÓN VALLE DEL LILI
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA ECIBIB
FREDY ARIZA CADENA, MD, MSc.
PRESIDENTE

FREDY ARIZA CADENA MD., MSc.
Presidente Comité de Ética en Investigación Biomédica
Fundación Valle del Lili.

Copia Archivo
Luz V

Anexo 2. Protocolo de realización de la PCR con los primers PCO3/PCO4 para el gen de β -globina.

- Se prepararon los primer adicionando 873 μ L de agua mili Q al cebador PCO3 y 876 μ L de agua mili Q al cebador PCO4; quedando ambos cebadores a una concentración de 100 μ M; se preparo una alícuota de los cebadores a una concentración de 10 μ M, con la ecuación 1.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (1)$$

Donde:

C_1 : Es la concentración inicial

V_1 : Es el volumen que se debe tomar (volumen inicial)

C_2 : Concentración final

V_2 : Volumen al que se quiere llegar (volumen final)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{10\mu\text{M} \times 200\mu\text{L}}{100\mu\text{L}} = 20\mu\text{L de cada cebador}$$

- Se prepara el mezcla para la reacción de PCR como lo muestra la tabla 1; las condiciones para el termociclador se evaluaron teniendo en cuenta las T_m teóricas de cada primer.
- Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 4 minuto, seguido de 40 ciclos de amplificación con una temperatura de desnaturalización 95°C por 1 minuto, anillamiento a 53°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minutos, finalmente un extensión a 72°C por 5 minutos.

Anexo 3. Protocolo de preparación de gel de agarosa al 2%

- Para la preparación del gel de agarosa se peso 4 gramos de agarosa en un Erlenmeyer y se adicionó 200mL de TBE, el cual fue llevado al microondas por 30 segundos donde se agito y se verifico si estaba disuelto.
- Al estas disuelta la agarosa se adiciono en un vaso desechable al cual se le adiciono 2,5 μ L de bromuro de etidio y se mezclo hasta la homogenización; esta mezcla es llevada a una cubeta electroforética con los peines adecuados para el número de muestras que se tienen.

- Cuando el gel solidifico se volteo el gel verificando para que lado se encuentran los electrodos y se adiciona buffer TBE hasta la marca que indica la cámara electroforética.

Anexo 4. Protocolo purificación de bandas

- Se corrió un gel de agarosa de bajo punto de fusión con las muestras de ADN.
- Se identificaron las bandas que tenían un peso de 332pb en el transiluminador y se cortaron con una cuchilla de bisturí estéril. Este paso se realizó en el transiluminador donde se podían observar las bandas. Cada banda se guardó en un tubo estéril de 1,5mL rotulado.
- Se pesó tres tubos eppendorf estéril de 1,5mL y se tomó el promedio de estas mediciones; también se peso el tubo con el fragmento cortado del gel de agarosa y se le resto el promedio del peso del tubo vacío.
- Se adicionó la solución de unión a membrana en una proporción de 10 μ L por 10mg de fragmento del gel y se mezcló con vortex, seguida de una incubación a 65°C por 10 minutos. Se realizó vortex cada pocos minutos.
- Se incubo a temperatura ambiente para dejar que la agarosa se precipitara y Se pasó el gel disuelto a una mini columna SV y se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente.
- El producto de la incubación se centrifugo a 14.300rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado. Se adiciono a la columna 700 μ L de solución de lavado de membrana y se centrifugo a 14.300rpm por 1 minuto, se descarta el filtrado

Nota: A la solución de lavado de membrana se le realizó una dilución con etanol al 95%.

- Se repitió el lavado con 500 μ L de solución de lavado de membrana y se centrifugo a 14.300rpm por 5 minutos se descarto el filtrado y la columna se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1,5mL y volvió a centrifugar por 1 minutos con la tapa abierta.
- Se adicionó 50 μ L de agua libre de nucleasas directamente en la columna y se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente por ultimo se centrifugo a 14.300rpm por 1 minutos. Se descarta la columna y se guarda el filtrado.

Anexo 5. Secuencias de ADN

>SEC4ST

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTACTGGTGACCCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTGGAATGG
GGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCTGCTCACTCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTGG
CCGCATTTGAGACAGGGGTATTTTGA GGCTGAGCAGATGTCAGTTAA

>SEC5ST

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTCTGGTGACCCCATCCCCCTACGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAATGG
GGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
CCGCATTTGAGACAGGGGTACGTTGAGGCTGARCAGATGTCAGTTAA

>SEC6ST

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTACTGGTGACCCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTGGAATG
GGGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
GGCCGCATTTGAGACAGGGGTATTTTGAAGGCTGAGCAGATGTCAGTTAA

>SEC7

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTCTGGTGACCCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTGGAATG
GGGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
GGCCGCATTTGAGACAGGGGTATTTTGAAGGCTGAGCAGATGTCAGTTAA

>SEC8

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTCTGGTGASCCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAATGG
GGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
CCGCATTTGAGACAGGGGTATTTTGAAGGCTGAGCAGATGTCAGTTAA

>SEC5LBM

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTCTGGTGACCCCATCCCCCTAYGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAATGG
GGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTCGGGTCC
CCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
CCGCATTTGAGACAGGGGTACGTTGAGGCTGARCAGATGTCAGWWAA

>SEC8LBM

GCCAGCCCACCTAGCGTGTCTTTGCTTTCTGGTGASCCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAATGG
GGTACCTAGTCCCCAGCCTGCTCCCTAGCCAGAGGCTCTAATGTACAATAAAGCAATGTGGTAGTTCCAACCTYGGGTCC
CCTGCTCAGCCCTCGTTGGGATCATCCTCCTCAGGGCAACCCCAACCCTGCCTCATTCTGCTTACCCCAACCGCTG
CCGCATTTGAGACAGGGGTACTTTGAGGCTGAGCAGATGTCAG