



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Frecuencia de la variante genética V158M del gen *COMT* en una muestra de la población mexicana

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KARINA IVETTE HERNÁNDEZ LEÓN

ASESORA: M en C. María del Carmen Chima Galán

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Frecuencia de la variante genética V158M del gen COMT en una muestra de la población mexicana.

Que presenta la pasante: **Karina Ivette Hernández León**

Con número de cuenta: **408008569** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dra. María del Carmen Chima Galán	
1er. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Ma. de los Angeles López Cabrera	

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

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud es la memoria del corazón.” Lao Tsé

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo, felicidad.

A mis padres Adela León y José Antonio Hernández, por acompañarme y apoyarme en todo momento, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación a lo largo de mi vida, pero sobre todo, por ser el mejor ejemplo para mí.

A mi hermano Horacio Antonio Hernández, por el hecho de formar parte de mi vida, por su apoyo y por darme momentos de alegría, felicidad y amor cuando más me hacían falta.

A mis maestros, que a lo largo de mi trayectoria, me han dado la oportunidad de aprender de ellos.

A la M. en C. María del Carmen Chima Galán, por brindarme su apoyo y conocimientos en la realización de este trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros, quienes siempre me apoyaron y me impulsaron a seguir adelante cuando estaba por rendirme, por estar presentes en los buenos y los malos momentos.

Gracias a todos por ser parte de esta gran aventura.

IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INVESTIGACIÓN.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE), bajo la dirección de la M. en C. María del Carmen Chima Galán.



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	10
ÍNDICE DE GRÁFICAS	11
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	12
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. CATECOLAMINAS	14
1.1.1. BIOSÍNTESIS	14
1.1.2. ALMACENAMIENTO	15
1.1.3. LIBERACIÓN	15
1.1.4. INACTIVACIÓN	17
1.2. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT)	20
1.2.1. ENZIMA	20
1.2.2. GEN <i>COMT</i>	20
1.2.2.1. POLIMORFISMOS DEL GEN <i>COMT</i>	21
1.2.2.2. <i>COMT</i> V158M (rs4680)	23
1.3. POLIMORFISMOS DE <i>COMT</i> Y SU RELACIÓN CON EL DOLOR	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	28
5.1. OBJETIVO GENERAL	28

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. METODOLOGÍA	29
6.1. TIPO DE ESTUDIO	29
6.2. MUESTRA	29
6.2.1.TAMAÑO DE LA MUESTRA	29
6.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN	30
6.4. RECLUTAMIENTO DE DONADORES	30
6.5. MÉTODOS DE LABORATORIO	31
6.5.1.DIAGRAMAS DE FLUJO	31
6.5.1.1. SELECCIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO	31
6.5.1.2. GENOTIPIFICACIÓN	32
6.5.2.TOMA DE MUESTRA	33
6.5.3.EXTRACCIÓN DE ADN	33
6.5.4.CUANTIFICACIÓN DE ADN	34
6.5.5.PCR	35
6.5.6.GENOTIPIFICACIÓN (PCR-RFLP's)	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1. GENOTIPIFICACIÓN	41
7.2. FRECUENCIA GENOTÍPICA	42
7.3. FRECUENCIA ALÉLICA	44
8. CONCLUSIONES	46
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
10. APÉNDICE	50
10.1 APÉNDICE A. Consentimiento informado	50
10.2 APÉNDICE B. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo V158M del gen <i>COMT</i> .	52

10.3 APÉNDICE C. Gráfico de frecuencias alélicas del 53
polimorfismo V158M del gen COMT.

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Relación de enfermedades y polimorfismos del gen <i>COMT</i> .	23
TABLA 2. Oligonucleótidos cebadores de la PCR del fragmento replicado.	36
TABLA 3. Reactivos utilizados para realizar la PCR del fragmento.	36
TABLA 4. Condiciones a las cuales se llevó a cabo la PCR del fragmento del exón 4 del gen <i>COMT</i> .	37
TABLA 5. Frecuencias y porcentajes de los genotipos obtenidos del polimorfismo V158M.	43
TABLA 6. Frecuencia alélica.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I. Vía de síntesis de las catecolaminas.	15
Figura II. Receptor colinérgico nicotínico.	16
Figura III. Liberación de catecolaminas adrenales.	17
Figura IV. Metabolismo de las catecolaminas por acción de la COMT y la MAO.	19
Figura V. El gen <i>COMT</i> y sus transcritos.	21
Figura VI. Distribución mundial de los alelos del polimorfismo V158M del gen <i>COMT</i> .	27
Figura VII. Genotipificación del polimorfismo del gen <i>COMT</i> por la técnica de PCR-RFLP's.	39

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Página
Fotografía I. Electroforesis del ADN extraído de las muestras de sangre.	34
Fotografía II. Espectrofotómetro UV NanoDrop® ND-1000	35
Fotografía III. Termociclador AXYGEN® MAXYGEN II.	37
Fotografía IV. Gráfica de la concentración de una muestra de ADN.	40
Fotografía V. Electroforesis del producto de PCR.	41
Fotografía VI. Genotipificación del polimorfismo V158M del gen <i>COMT</i> .	42

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo V158M del gen <i>COMT</i> .	43
Grafica 2. Frecuencias genotípicas expresadas en porcentajes para el polimorfismo V158M del gen <i>COMT</i> .	44
Grafica 3. Frecuencia alélica.	45

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AD	Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Catecolaminas
Ca ⁺	Ion calcio
COMT	Catecol-o-metil-transferasa
COMT-M	Catecol-o-metil-transferasa asociada a membrana
COMT-S	Catecol-o-metil-transferasa soluble
DBH	Dopamina-β-hidroxilasa
DMSO	Dimetil sulfoxido
DOPA	Dihidroxifenilalanina
G	Guanina
GABA	Ácido-γ-amino butírico
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
Kb	Kilo bases
MAO	Monoaminoxidasa
Met, M	Metionina
Mg ⁺²	Ion magnesio
ml	mililitros
Na ⁺	Ion sodio
ng	nanogramos
NlaIII	Enzima de restricción obtenida de la bacteria <i>Neisseria lactamica</i>

pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
PEGE2	Prostaglandina E2
PM	peso molecular
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
TH	Tirosina hidroxilasa
Val, V	Valina
VMAT	Transportador de monoaminas
μl	microlitros

1. MARCO TEÓRICO

1.1. CATECOLAMINAS

El término catecolaminas designa a todos aquellos compuestos que contienen el grupo catecol (orto dihidroxibenceno) y una cadena lateral con un grupo amino².

Las catecolaminas de mayor importancia fisiológica son la dopamina, noradrenalina y adrenalina, que participan en los mecanismos integrativos, tanto neurales como endócrinos. Por esta razón, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal conforman una unidad anatómica y fisiológica conocida como sistema simpático-adrenal².

1.1.1. BIOSÍNTESIS.

La síntesis de catecolaminas se realiza a partir de la tirosina, que puede sintetizarse en el hígado a partir de fenilalanina o provenir de la dieta. Consta de los siguientes procesos (Figura I):

a) Hidroxilación de la tirosina: proceso catalizado por la enzima Tirosina-Hidroxilasa (TH), convirtiendo a la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA). Este proceso es el paso limitante en la biosíntesis de las catecolaminas, debido a que la TH se encuentra “finamente” regulada²².

b) Descarboxilación: la DOPA se transforma en dopamina, por una reacción de descarboxilación producto de la actividad de la enzima Descarboxilasa de L-Aminoácidos Aromáticos (AD). La dopamina, una vez formada en el citoplasma, es transportada activamente al interior de las vesículas granulares, donde continúa la biosíntesis de las catecolaminas²².

c) Hidroxilación de Dopamina: por la actividad de la enzima Dopamina- β -hidroxilasa (DBH), se produce la hidroxilación de la dopamina para dar lugar a la noradrenalina. En la médula adrenal, la noradrenalina es liberada de los gránulos vesiculares al citoplasma, para continuar con la biosíntesis²².

d) Metilación de la Noradrenalina: se lleva a cabo en el nitrógeno del grupo amino de la noradrenalina por acción de la enzima Feniletanolamina-N-Metil-Transferasa (PNMT), dando

como producto la adrenalina, que luego de ser sintetizada es transportada al interior de vesículas granulares²².

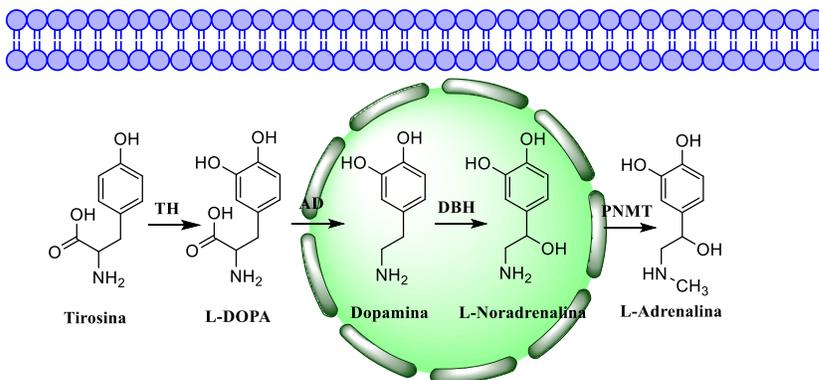


Figura I. Vía de síntesis de las catecolaminas. Tomado y modificado de Velázquez, 2003.

1.1.2.ALMACENAMIENTO.

La mayor parte de las catecolaminas es almacenada en gránulos o vesículas, tanto en células neuronales como en células cromafines de la médula suprarrenal⁹ para garantizar su descarga regulada y evitar su degradación por la Monoaminoxidasa (MAO) en el citoplasma celular⁴.

Dentro de las vesículas, las catecolaminas se encuentran formando un complejo con ATP para ser liberadas en respuesta a un estímulo. La captación de las catecolaminas en estas vesículas se encuentra facilitada por un mecanismo de transporte activo que utiliza el Transportador Vesicular de Monoaminas (VMAT's), el cual, acoplado con ATP, funciona como una bomba que mantiene un amplio gradiente eléctrico. Cabe mencionar que este transportador se expresa exclusivamente en las células neuronales⁴.

1.1.3.LIBERACIÓN.

La liberación de catecolaminas se produce por el mecanismo de exocitosis. El estímulo fisiológico para su liberación es provocado por el neurotransmisor acetilcolina, el cual es liberado en las terminales

nerviosas simpáticas que inervan a la médula adrenal. La acetilcolina, actuando sobre receptores llamados nicotínicos, produce la despolarización de la membrana celular aumentando su permeabilidad al Na^+ . Esto produce un cambio conformacional en las proteínas de la membrana plasmática, permitiendo el ingreso de Ca^{+2} al interior (Figura II). De esta manera se considera que el aumento de Ca^{+2} intracelular desencadena la secreción de catecolaminas por un mecanismo de exocitosis que implica el adosamiento de las vesículas electrodensas entre sí y con la membrana plasmática; produciéndose una fusión de las mismas y descargando todo el contenido soluble del gránulo al espacio extracelular² (Figura III).

El proceso de liberación de catecolaminas está sometido a múltiples influencias reguladoras, de carácter facilitador e inhibidor⁹.

- Facilitadores: angiotensina, acetilcolina (a ciertas concentraciones), adrenalina mediante receptores β y el ácido γ -aminobutírico (GABA) mediante receptores GABA_A ⁹.
- Inhibidores: prostaglandina E2 (PGE2), péptidos opioides, acetilcolina, dopamina, adenosina y GABA a través de receptores GABA_B ⁹.

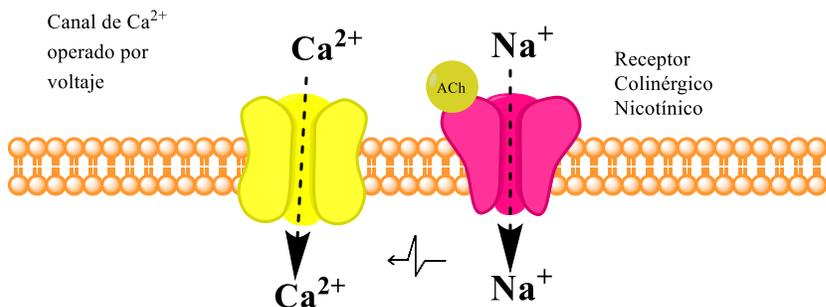


Figura II. Receptor colinérgico nicotínico. Tomado y modificado de Brandan NC, Llanos IC, Ruiz D, Rodríguez AN, 2010.

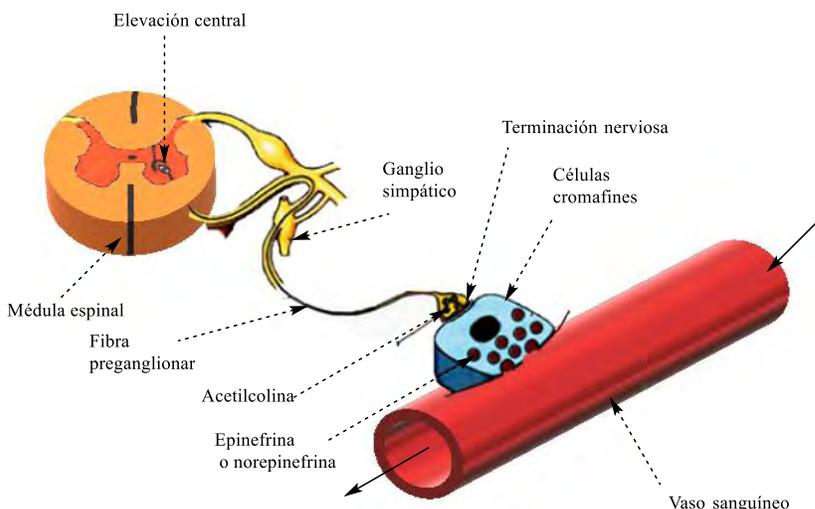


Figura III. Liberación de catecolaminas adrenales. Tomado y modificado de Brandan NC, Llanos IC, Ruiz D, Rodríguez AN, 2010.

1.1.4. INACTIVACIÓN.

La inactivación de las catecolaminas se lleva a cabo mediante tres procesos, que son:

- a) Captación neuronal o captación 1: es un proceso muy rápido, cuya eficiencia en los tejidos es proporcional a la densidad de la inervación simpática. Es un proceso de transporte a través de membrana, saturable y que requiere energía²².
- b) Captación por tejidos extraneuronales o captación 2: este proceso carece de especificidad, es independiente de la presencia de Na^+ y Ca^{+2} extracelulares y no es inhibido por cocaína. Todas las CA son sustratos aptos para este tipo de captación que no se relaciona con elementos nerviosos, sino con otras células. Es bloqueado por corticosteroides, por los metabolitos O-metilados de las catecolaminas y por β -haloalquiminas, un grupo de drogas bloqueantes irreversibles de los receptores adrenérgicos α^2 .

c) Transformación metabólica (Figura IV): en este proceso intervienen principalmente dos enzimas, la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoaminoxidasa (MAO). La MAO es una enzima oxidativa mitocondrial que actúa en la cadena lateral; se encuentra en neuronas y en células no neuronales. Su actividad se centra en la fracción citoplasmática de las monoaminas no protegidas en el interior de las vesículas. La COMT es una enzima de la fracción soluble citoplasmática e incluso puede estar asociada a la membrana celular, pero no se encuentra ligada particularmente a las neuronas catecolaminérgicas. Produce metilación en el grupo m-hidroxilo del núcleo catecol transfiriendo el radical metilo de la S-adenosilmetionina. Precisa Mg^{+2} para su actividad²².

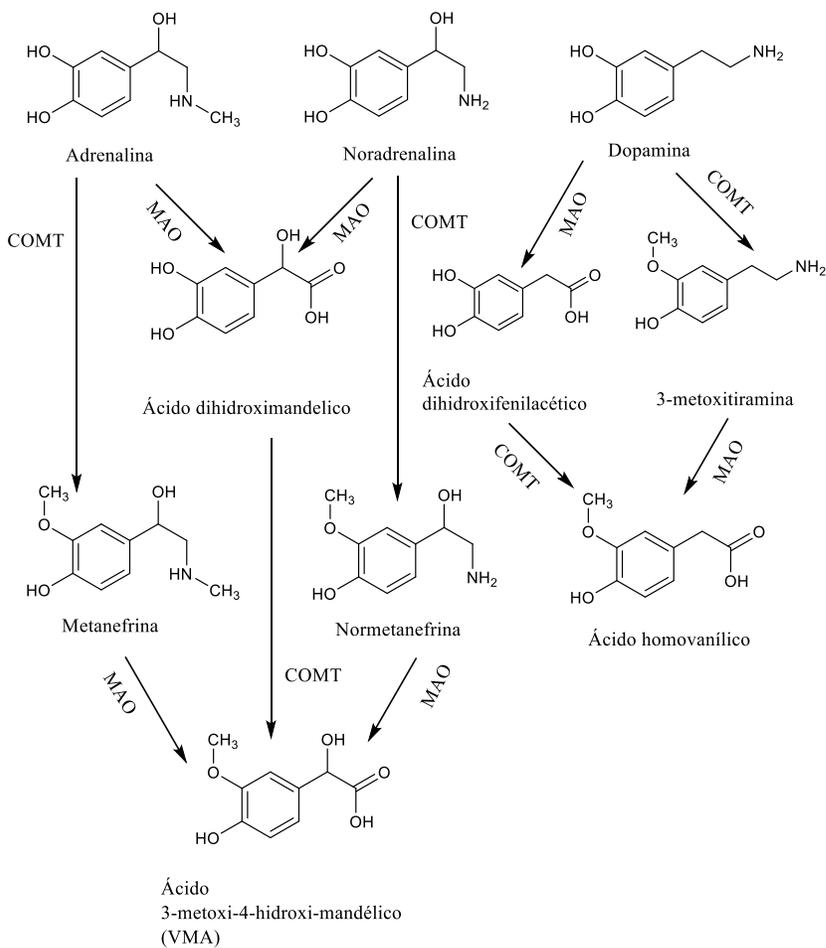


Figura IV. Metabolismo de las catecolaminas por acción de la COMT y la MAO. Tomado y modificado de Katzung y Masters AJT, 2013

1.2. CATECOL – O – METILTRANSFERASA (COMT)

1.2.1. ENZIMA

La catecol – O – metiltransferasa (COMT), es una enzima cuya función es la inactivación de catecolaminas mediante la transferencia de grupos metilo de la S-adenosilmetionina al grupo hidroxilo ubicado en la posición meta de la molécula².

Se trata de una enzima citoplásmica de la que existen dos formas diferenciadas en base a su localización subcelular, la forma soluble (COMT-S) y la forma asociada a membrana (COMT-M)¹⁰.

Desde la década de los noventa, se ha investigado más a fondo la actividad de la enzima y su relación con algunas enfermedades, de esta manera, con ayuda de la medicina genómica, se han detectado variantes en el gen que codifica para la enzima¹².

1.2.2. GEN *COMT*.

El gen *COMT* se localiza en el cromosoma 22q11.2 (Figura V); se compone de seis exones de los que solo cuatro son codificantes. Tiene aproximadamente 27 Kb y codifica dos transcritos a partir de dos promotores, COMT-M de 1.5 Kb y COMT-S de 1.3 Kb.⁶

El gen que codifica a COMT, tiene dos alelos polimórficos (Val=Valina o H=High o G=Guanina, y Met=Metionina o L=Low o A=Adenina) y da lugar a 3 genotipos: Val/Val (HH=actividad enzimática alta), Val/Met (HL=actividad enzimática media) y Met/Met (LL=actividad enzimática baja).¹²

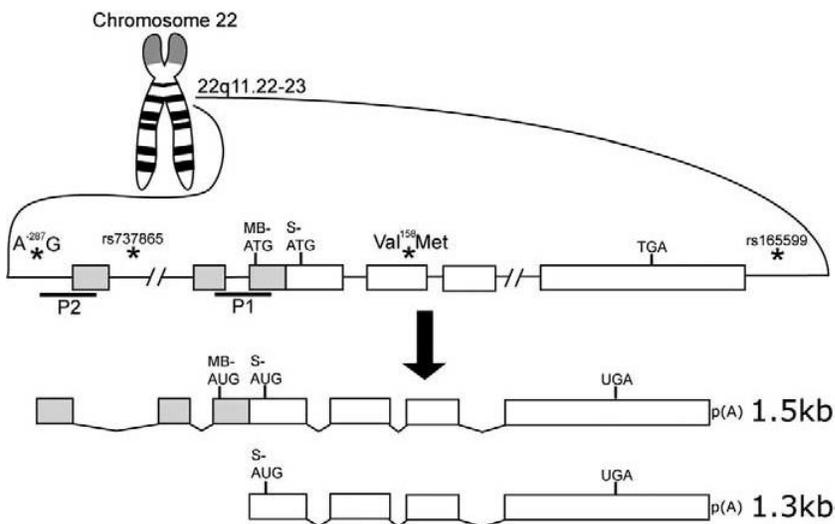


Figura V. El gen COMT y sus transcritos. Los asteriscos indican algunos polimorfismos conocidos. Tomada y modificada de Bray NJ y cols. 2003.

1.2.2.1. POLIMORFISMOS DEL GEN COMT

El gen COMT presenta una serie de variantes polimórficas de una sola base (SNP) definidas por cambios en un codón de su secuencia de ADN. Algunas de estas variantes, debido a cambios significativos en los aminoácidos codificados conducen a variantes de la proteína con una distinta capacidad funcional.⁶

La mayoría de estos polimorfismos se localizan en regiones no codificantes o no alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína sintetizada.

Debido a que el único SNP que ocasiona un cambio en la secuencia de aminoácidos de la enzima COMT es el rs4680, que promueve la sustitución de valina (V) por metionina (M), se propone la evaluación de la frecuencia en que se presenta dicho polimorfismo en la población, esto debido a que se ha relacionado con una gran variedad de padecimientos tales como: cáncer, dolor crónico, esquizofrenia, depresión, etc.³

El polimorfismo V158M se considera como el más importante en cuanto a la variación de la actividad enzimática, sin embargo, algunos otros polimorfismos conocidos del gen COMT han sido descritos como posibles reguladores de esta actividad, aunque con una relevancia cuantitativamente menor. Algunos de estos son rs737865 (localizado en el intrón 1), rs165599 (en la región flanqueante 3') y rs2097603 (en la región promotora P2). Mientras que los dos primeros podrían ejercer una función reguladora en la transcripción a ARN mensajero ³, rs2097603 se ha propuesto como otra posible variante funcional ⁵.

Tabla 1. Relación de enfermedades y polimorfismos del gen *COMT*

Polimorfismo de COMT	Enfermedad con la que se relaciona.
rs4680	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia, dolor crónico, anorexia nerviosa, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), Cáncer de mama.
rs4633	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia, dolor crónico.
rs4818	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia, dolor crónico.
rs6267	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia, dolor crónico.
rs6269	Dolor crónico.
rs165599	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia.
rs1800706	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia.
rs2097603	Dolor crónico.
rs737865	Susceptibilidad a padecer Esquizofrenia.

Información obtenida de Craddock N, Owen M J y O'donovan M C, 2006.

1.2.2.2. COMT V158M (rs4680)

Para entender de una mejor manera lo que buscamos en el análisis de las muestras donadas, es necesario conocer un poco más acerca del polimorfismo de interés.

El polimorfismo rs4680, localizado en el exón 4 de la secuencia, aparece de forma predominante en humanos⁵. Consiste en

una sustitución de una guanina por adenina, que se traduce en una sustitución de valina por metionina la posición 158 de COMT- M. Este cambio supone una diferencia sustancial en la función enzimática debido a que metionina es un aminoácido hidrófilo, mientras que valina es hidrófobo; dicha variación conduce a un cambio conformacional de la proteína COMT de tal manera que las formas Met158 sean menos termoestables, por lo que muestra menor actividad a temperatura fisiológica⁵.

Puesto que estos alelos son codominantes, en estudios neurogenéticos, se ha demostrado que los individuos homocigotos para el alelo Met158 tienen una actividad de COMT un tercio menor que los individuos homocigotos para el alelo Val158, de tal manera que los individuos heterocigotos presentan una actividad intermedia. Esto explica la distribución trimodal de los niveles de actividad de la enzima COMT⁸.

De forma interesante, no ha sido posible identificar un polimorfismo similar a este en ninguna otra especie animal, incluyendo primates, existiendo en estos sólo la forma Val158¹⁷ y en roedores una forma Leu (con una leucina en esa posición, un aminoácido aún más hidrófobo que Valina), de una actividad aún mayor que las formas Val158 o Met158²¹. Se ha sugerido que estos datos podrían indicar, por tanto, que el alelo ancestral es el Val158 o de alta actividad, siendo el alelo Met158 único de la especie humana. Por otro lado, la presencia del alelo Met158 también se asocia a fenotipos en desventaja, como una respuesta emocional desadaptada²³ o incluso mayor frecuencia de cáncer de mama¹⁴, lo cual explicaría la persistencia de ambos alelos y las diferentes distribuciones en distintos grupos humanos, que estarían basadas en fuerzas selectivas dependientes de variables contextuales y ambientales.

1.3. POLIMORFISMOS DE *COMT* Y SU RELACIÓN CON EL DOLOR

Encontrar una definición precisa del dolor ha sido una tarea compleja, ya que nada puede definir el conjunto de matices sensoriales y afectivos que induce una experiencia dolorosa. El dolor es el motivo principal de consulta en la mayoría de las especialidades médicas, además, como síntoma fundamental, es la clave principal que nos indica que algo no funciona bien en el organismo¹⁹.

Según el comité de taxonomía de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, IASP (por sus siglas en inglés), el dolor se define como “una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial”¹³.

Otra definición más cercana a la práctica clínica, afirma que el dolor “es una experiencia perceptiva sensitiva desagradable acompañada de una respuesta afectiva, motora, vegetativa e incluso de la personalidad”²⁰.

Como hemos visto, *COMT* es una de las enzimas metabólicas de catecolaminas, actuando como un modulador de la neurotransmisión dopaminérgica. Cuando existen diferentes niveles de la actividad de *COMT*, los cuales responden a los diferentes genotipos del gen *COMT* (polimorfismo V158M), se pueden apreciar cambios importantes en las funciones regulatorias de las neurotransmisiones, incluyendo el receptor opioide μ ²³.

En modelos animales, se ha observado que la actividad disminuida de *COMT*, asociada al genotipo Met/Met en el gen *COMT*, reduce el contenido neuronal de péptidos de encefalina e induce en compensación, un incremento de las concentraciones de los receptores opioides μ en varias regiones del cerebro. En contraparte, un incremento en la actividad de *COMT*, asociada al genotipo Val/Val, resulta en el efecto opuesto sobre el receptor μ ²³.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presente investigación servirá para determinar la frecuencia de la variante genética V158M del gen COMT en la población mexicana; el cual se sabe que presenta codominancia alélica.

3. JUSTIFICACIÓN

La enzima Catecol-O-metiltransferasa (COMT) interviene de forma significativa en la inactivación de las catecolaminas y Catecol-estrógenos, de forma que, en presencia del ion magnesio, transfiere el grupo metilo de S-adenosil-L-metionina al sustrato correspondiente y secundariamente en la síntesis de neuropéptidos ¹. Por tanto, su actividad se relaciona con los trastornos de ansiedad, la migraña, la adicción a la nicotina y las respuestas alteradas en el metabolismo de algunos fármacos antidepresivos, así como la sensibilidad al dolor en personas sanas ¹⁰.

En este sentido, recientemente se ha estudiado un polimorfismo localizado en la posición 472 del gen COMT, el cual consiste en una sustitución de una Guanina por una Adenina que se traduce en la sustitución de Valina por Metionina en la posición 158 de la proteína. Puesto que estos alelos son codominantes, se ha demostrado que los individuos homocigotos para el alelo Met158 tienen una actividad de COMT un tercio menor que los individuos homocigotos para el alelo Val158, de tal manera que los individuos heterocigotos presentan una actividad intermedia. Como se muestra en la Figura VI, se ha reportado que la distribución alélica de este polimorfismo varía notablemente en diferentes poblaciones de distinto origen étnico, presentándose los niveles más altos de heterocigosidad del gen en población europea, manteniéndose en éstas una frecuencia alélica de cerca del 50%, mientras que en el resto de poblaciones hay una menor heterocigosidad y un predominio del alelo Val158 ²¹.

4. HIPÓTESIS

Si tomamos en cuenta que la población mexicana está compuesta de diferentes linajes a partir de los cuales existen una gran variedad de mestizajes, y con base en los datos de investigaciones previas en Europa, Asia y Sudamérica, entonces:

- a. El genotipo homocigoto para valina (G-G) del gen *COMT*, tendrá una frecuencia de 46 a 48%
- b. El genotipo homocigoto para metionina (A-A) del gen *COMT*, tendrá una frecuencia de 2 a 4%
- c. El genotipo heterocigoto (A-G) del gen *COMT* tendrá una frecuencia de 50%

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante genética V158M (rs4680) del gen *COMT* en una muestra de la población mexicana (donadores de sangre del CMN 20 de Noviembre ISSSTE), con el fin de conocer y analizar si estas son similares a las presentadas en otras poblaciones mundiales, así como establecer precedentes para futuras investigaciones acerca de este polimorfismo.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Genotipificar la variante genética V158M del gen *COMT* en una muestra de la población mexicana.
- Analizar la frecuencia genotípica y alélica en una muestra de la población mexicana.
- Establecer precedentes para futuros estudios de asociación a enfermedades crónicas.

6. METODOLOGÍA

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo, observacional y transversal.

6.2. MUESTRA

La muestra probabilística corresponde a ciento veintisiete individuos en total, todos ellos donadores de sangre del banco de sangre del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSTE. La muestra obtenida fue la recolectada en un periodo de aproximadamente cuatro meses, en el cual se invitó a los donadores a participar en el estudio.

6.2.1. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para obtener el tamaño de la muestra probabilística, se realizaron los siguientes cálculos:

Muestra sin ajustar n' : $n' = \frac{S^2}{V^2}$ dónde: $S^2 = p(1-p)$ y V^2 es la varianza poblacional, que se establece como el error estándar con el que se estima trabajar.

Por tanto, utilizando como probabilidad (p) el estimado de 4.0% para el alelo Met158 y un error estándar de 0.015, se obtiene:

$$n' = \frac{0.04(1 - 0.04)}{(0.015)^2} = \frac{0.0384}{0.000225} = 170.66$$

Muestra ajustada n : $n = \frac{n'}{1+n'/N}$ dónde: N es el total de donadores (población total)

Sustituyendo los valores en la fórmula anterior, se obtiene:

$$n = \frac{170.66}{1 + 170.66/500} = \frac{170.66}{1 + 0.34132} = \frac{170.66}{1.34132} = 127.23$$

Nota: se toma como población total 500 donadores, esto es porque se obtuvo dicha cantidad de muestras en un periodo de cuatro meses, de las cuales se seleccionó una muestra probabilísticamente representativa de la población mexicana.

6.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

a) Criterios de inclusión

- Individuos sanos en calidad de donadores de sangre que deseen participar voluntariamente en el estudio
- Ambos sexos
- Mayores de edad
- Que firmen el consentimiento informado

b) Criterios de exclusión

- Historia personal y/o familiar de alguna enfermedad crónica relacionada con el polimorfismo a estudiar (dolor crónico, enfermedades neuropsiquiátricas, cáncer).

c) Criterios de eliminación

- No se obtuvo ADN
- Muestras de ADN de mala calidad

6.4. RECLUTAMIENTO DE DONADORES

Los donadores fueron reclutados en el banco de sangre del Centro Médico Nacional “20 de noviembre”.

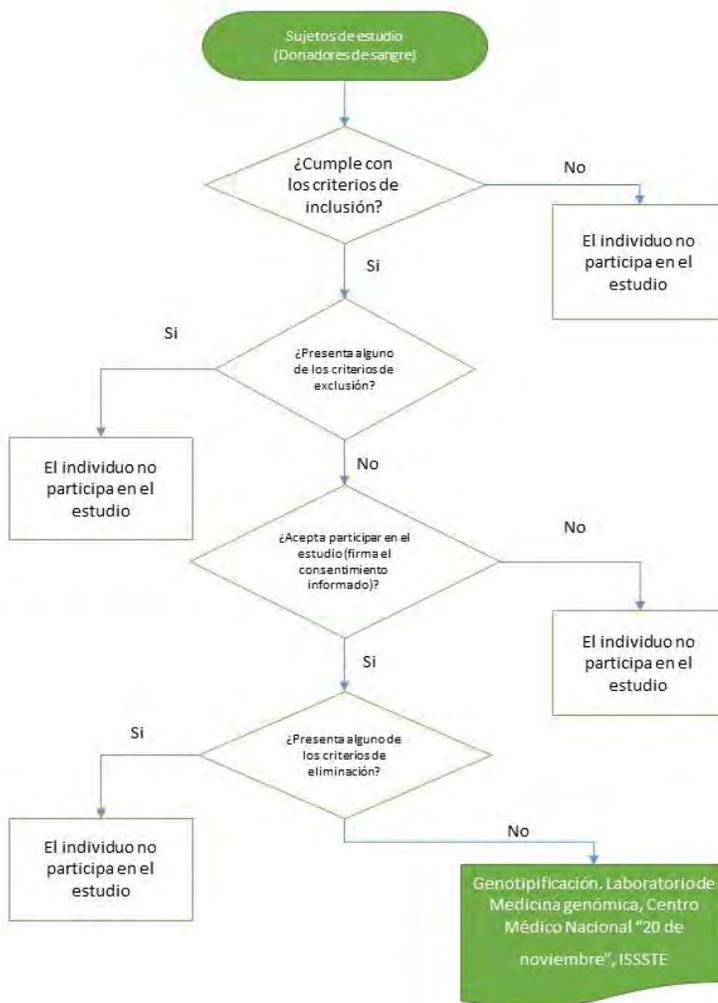
Cada uno de los donadores que aceptaron participar en el proyecto firmó un consentimiento informado diseñado para tal fin cumpliendo con lo indicado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Quinto, Capítulo Único. (Apéndice 1).

Los donadores que cumplieron con los criterios de inclusión fueron incorporados a la investigación, luego de la firma del consentimiento informado.

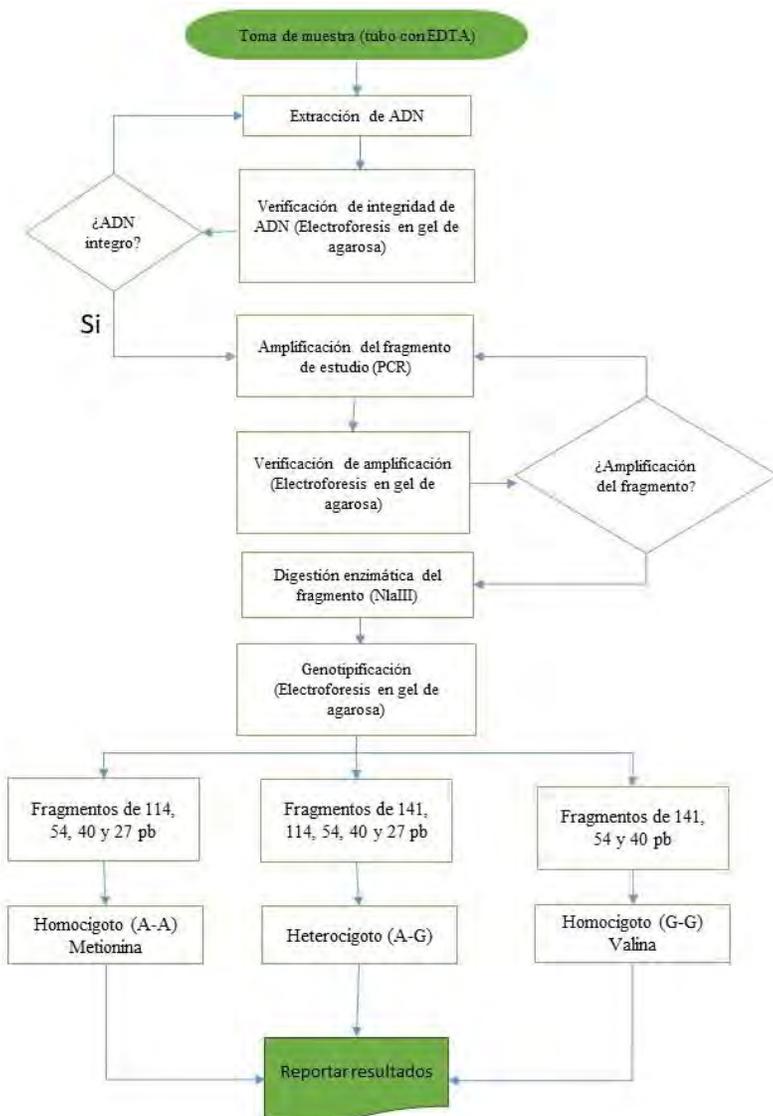
6.5. MÉTODOS DE LABORATORIO

6.5.1. DIAGRAMAS DE FLUJO

6.5.1.1. SELECCIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO



6.5.1.2. GENOTIPIFICACIÓN



6.5.2.TOMA DE MUESTRA

Con apoyo del personal del banco de sangre del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE, se extrajeron 5ml de sangre de sangre periférica, con vacutainer, anti coagulada con EDTA (Tubo con tapa morada), con la finalidad de inhibir la participación del ion calcio (Ca^{+2}) en la cascada de coagulación, sin afectar la morfología de las células hemáticas. Posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4° C.

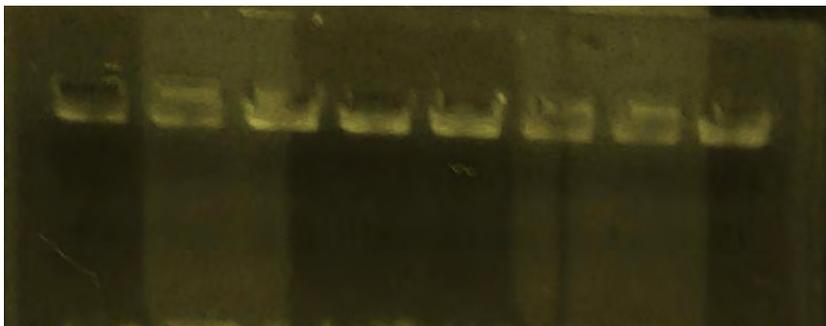
6.5.3.EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo transfiriendo 500µl de sangre completa anti coagulada (previamente homogeneizada) a un tubo Eppendorf de 1ml, a la que se le adicionó el mismo volumen de solución de lisis (solución de cloruro de amonio/bicarbonato de amonio 10:1), se mezcló y se incubó a 4°C por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con solución de lisis y uno con solución salina fisiológica (1ml). Terminados los lavados, se resuspendió el botón en 570µl de solución de NaCl 5mM, a la suspensión se le adicionaron 40µl de SDS al 10%. La mezcla anterior se agitó durante 5 minutos en el vórtex y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo Eppendorf de 1 ml y se le adicionaron 600 µl de una mezcla de Cloroformo–Alcohol isoamílico (49:1) y se mezcló en el vórtex por 2 minutos, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 minutos.

La fase orgánica (fase superior) se transfirió a un frasco con 4 ml de Etanol absoluto (pureza 100%) frío para favorecer la precipitación del ADN y se dejó a -20°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas, se toma el ADN (grumo blanco-transparente) y se transfiere a un tubo Eppendorf de 500µl que contiene 400µl de Etanol al 70% frío. El contenido del tubo se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 minutos, se retiró el sobrenadante y dejó evaporar el etanol a sequedad.

El botón seco obtenido se resuspendió en agua inyectable, entre 100 y 200µl, dependiendo del tamaño del botón.

La extracción de ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, la cual se corrió a 80 volts por 20 minutos, con la finalidad de observar la integridad del material genético (Fotografía I).



Fotografía I. Electroforesis del ADN extraído de las muestras de sangre. Se observa que hay material genético suficiente en la muestra.

6.5.4. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

Para los fines de este trabajo, la concentración más adecuada de ADN en las muestras tenía que ser mayor o igual a 50ng/μl. Por esta razón, en muestras con concentración menor, se repitió, un máximo de dos veces, la extracción del material genético.

La cuantificación de las muestras se realizó con ayuda de un micro espectrofotómetro UV NanoDrop® modelo ND1000 (Fotografía II), utilizando como blanco agua inyectable. Para llevar a cabo la cuantificación, se colocan en el equipo 2μl de la muestra en el sensor, que succiona la muestra y la analiza a una λ de 230nm, traduciendo la información, por medio de un software, para dar la concentración y pureza del material genético (Fotografía IV)



Fotografía II. Espectrofotómetro UV NanoDrop®ND-1000.

6.5.5. PCR (REACCIÓN EN CADENA DE AL POLIMERASA)

La PCR es una técnica que tiene como objetivo la amplificación (in vitro) directa, de un gen o fragmento de ADN específico, por lo que se requiere conocer la secuencia del fragmento o parte de ella. Consta de tres procesos básicos que son: Desnaturalización, Hibridación y Replicación²⁰.

Para la presente investigación, se realizó la técnica de PCR para amplificar un fragmento del exón 4 del gen *COMT*, por lo que se recurrió a buscar la secuencia de dicho gen, específicamente del exón antes mencionado en la base de datos Genbank, localizando así la secuencia donde se encuentra el polimorfismo rs4680 (V158M). Esto con la finalidad de diseñar los oligonucleótidos, cuya función es ser los cebadores o primers (Tabla 2) que delimitaron el fragmento que se amplificó.

Los reactivos utilizados en la PCR y las condiciones del termociclador para llevar a cabo la reacción, se muestran en la tabla 3 y 4, respectivamente.

Tabla 2. Oligonucleótidos cebadores de la PCR del fragmento replicado.

rs4680 Fw	5'TAC TGT GGC TAC TCA GCT GT3'
rs4680 Rv	5'TGA AGC TGG TGT GAA CAC CT3'

Tabla 3. Reactivos utilizados para realizar la PCR del fragmento.

Reactivo	Volumen por reacción.
H ₂ O grado Biología Molecular	7.4µl
Buffer de MgCl ₂	2.5µl
dNTP's	0.5µl
Primer Forward	0.25µl
Primer Reverse	0.25µl
DMSO	0.5µl
Go-Taq Polimerasa	0.1µl
DNA genómico	1µl
Volumen total	12.5 µl

Tabla 4. Condiciones a las cuales se llevó a cabo la PCR del fragmento del exón 4 del gen *COMT*.

Condición	Tiempo	Temperatura °C	Ciclos
Desnaturalización inicial	3 minutos	95	1
Desnaturalización	30 segundos	95	35
Alineamiento	30 segundos	60	
Extensión	30 segundos	72	
Extensión final	5 minutos	72	1
Enfriamiento	∞	4	1

La reacción de PCR se realizó en un termociclador AXYGEN (Fotografía III).



Fotografía III: Termociclador AXYGEN® MAXYGEN II

Al finalizar la reacción, se comprobó la amplificación del fragmento por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, la cual se dejó correr durante 30 minutos a 80 volts.

6.5.6.GENOTIPIFICACIÓN.

La genotipificación del polimorfismo V158M del gen *COMT*, se realizó mediante la técnica de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), la cual consiste en la digestión del producto de PCR con una enzima de restricción, para ver los fragmentos resultantes o fragmentos de restricción del gen⁸.

El producto de PCR se sometió a digestión con la enzima de restricción NlaIII, *Neisseria lactamica* (New England Biolabs). En primer lugar se preparó una mezcla con buffer (1X) y la enzima, del cual se agregaron 1.2µl (1.2 U) a 10µl del producto de PCR (total: 11.2µl). Acto seguido, se incubaron en un termoblock a 37°C durante dos horas (temperatura a la que la enzima es activa).

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 4.5%, el cual se dejó correr a 80 volts por un tiempo de 135 minutos para evidenciar los fragmentos (bandas) que se espera obtener tras la digestión enzimática, (Figura VII).

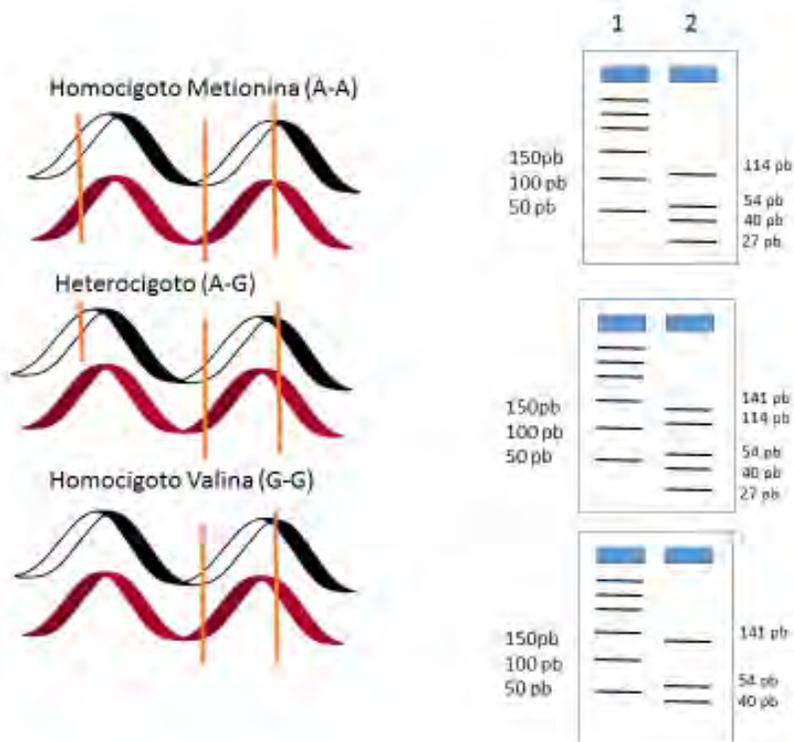
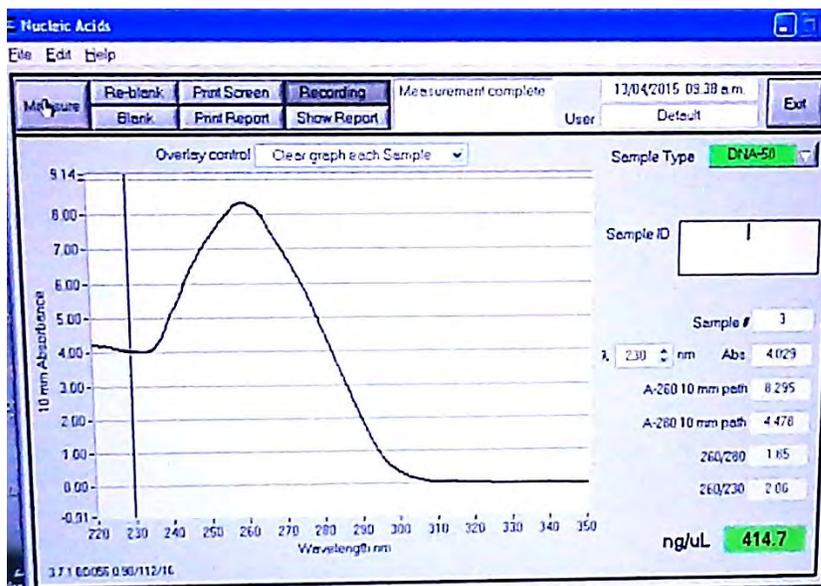


Figura VII. Genotipificación del polimorfismo V158M del gen *COMT* por la técnica de PCR-RFLP's. La enzima NlaIII, reconoce la secuencia 5'...CATG...3' 3'...GTAC...5', encontrando así dos o tres sitios de corte. Izquierda: se muestra un esquema de los sitios de corte según el genotipo. Derecha: se muestra un esquema de los resultados esperados en la electroforesis en gel; 1. Marcador de peso molecular de 50pb, 2. Resultados esperados por genotipo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

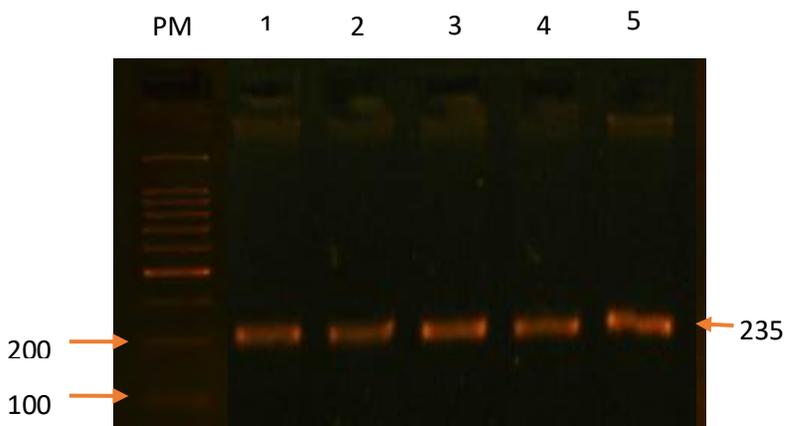
Con propósito de conocer la frecuencia con que se presenta la variante genética V158M del gen COMT en la población mexicana, se analizaron 127 muestras de ADN de donadores de sangre



Fotografía IV: Grafica de la concentración de una muestra de ADN. Como se observa en la esquina inferior derecha, se trata de una muestra con una concentración de 414.7ng/μl

Como se ha mencionado en la metodología, todas las muestras de ADN extraídas fueron cuantificadas, obteniendo concentraciones de entre 50 y 500 ng/μl, con una relación 260/280 de entre 1.78 y 1.82 la cual es indicativa de buena calidad en el material extraído (Fotografía IV).

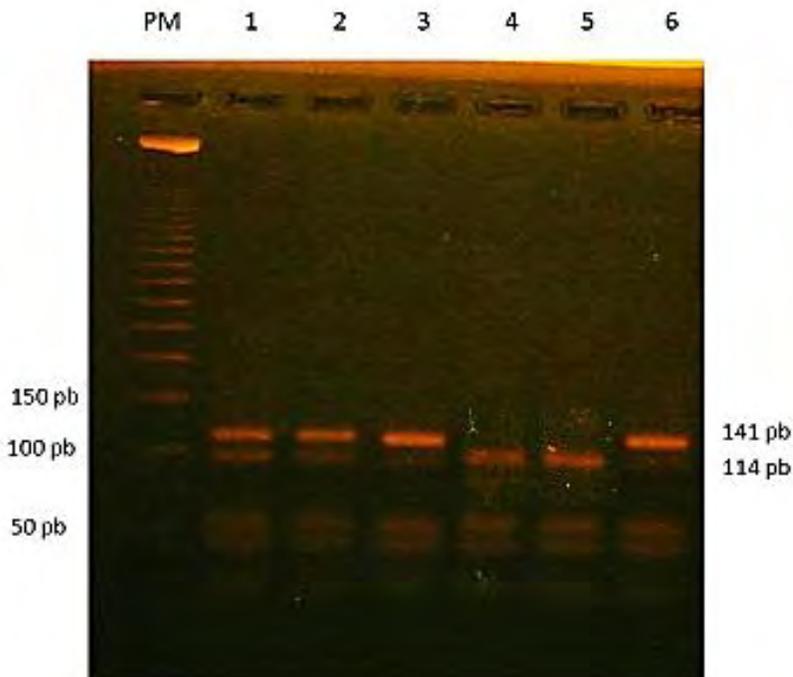
Con el ADN obtenido de la extracción de cada una de las muestras, se efectuó la PCR para la amplificación de un fragmento del exón 4 del gen COMT, obteniéndose un fragmento de 235 pares de bases (pb) que se muestran en la Fotografía V.



Fotografía V. Electroforesis del producto de PCR (pPCR). En esta fotografía observamos en el primer carril el marcador de peso molecular (PM) de 100 pb, seguido de los carriles 1-5, donde observamos el fragmento amplificado de 235pb.

7.1. GENOTIPIFICACIÓN

Con los productos de PCR que se obtuvieron, se procedió a la digestión enzimática, obteniendo los diferentes genotipos como se muestra en la Fotografía VI.



Fotografía VI. Genotipificación del polimorfismo V158M. PM. Marcador de peso molecular. Muestras 1 y 2, Heterocigotos (AG). Muestras 3 y 6, Homocigotos de Valina (GG). Muestras 4 y 5, Homocigotos de Metionina (AA).

7.2. FRECUENCIA GENOTÍPICA

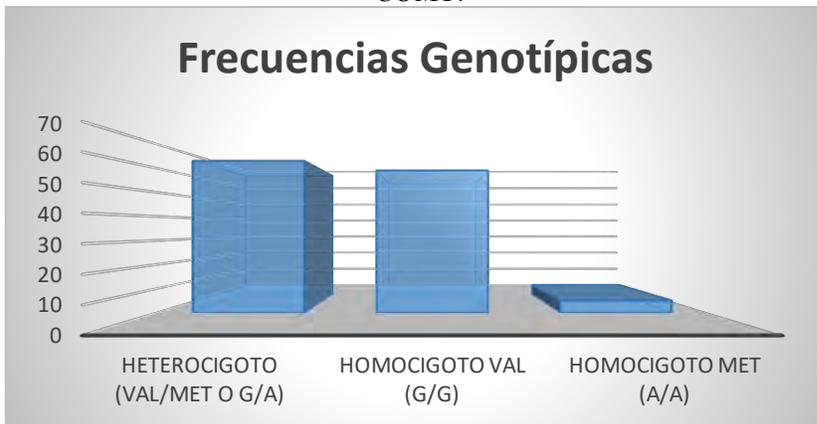
Las frecuencias y porcentajes se obtuvieron mediante tratamiento estadístico de datos y se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias y porcentajes de los genotipos obtenidos del polimorfismo V158M.

Genotipo	Homocigoto Metionina (AA)	Homocigoto Valina (GG)	Heterocigoto (AG)
Frecuencia	5	59	63
Porcentaje	3.9	46.5	49.6

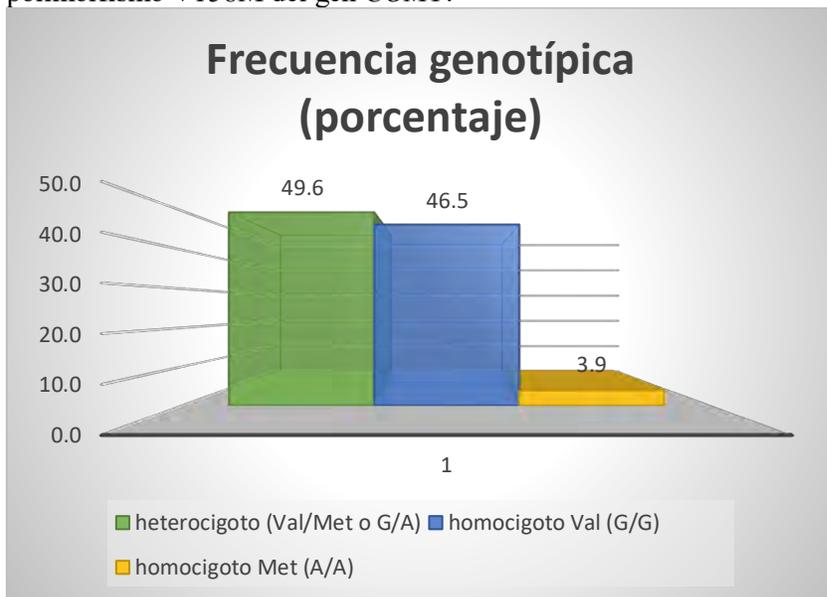
En la gráfica 1 podemos observar las frecuencias genotípicas en la muestra analizada, siendo el genotipo heterocigoto (AG) el que se presenta con mayor frecuencia y el genotipo homocigoto para metionina (AA) el menos frecuente.

Gráfica 1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo V158M del gen *COMT*.



En la gráfica 2, podemos observar las frecuencias genotípicas, en porcentajes, obtenidas de las muestras analizadas; de tal forma que se aprecia un mayor porcentaje de muestras cuyo genotipo es heterocigoto (AG) y el menor porcentaje del genotipo homocigoto para metionina (AA).

Grafica 2. Frecuencias genotípicas expresadas en porcentajes para el polimorfismo V158M del gen *COMT*.



7.3. FRECUENCIA ALÉLICA

Al igual que la frecuencia genotípica, se analizó la frecuencia alélica en la muestra, obteniendo resultados similares a los reportados en otras poblaciones. Una de las poblaciones más estudiadas en cuanto a este polimorfismo, es la española, en la cual se han reportado para el alelo A (Met) una frecuencia de 35.2% y para el alelo G (val) una frecuencia de 64.8%.

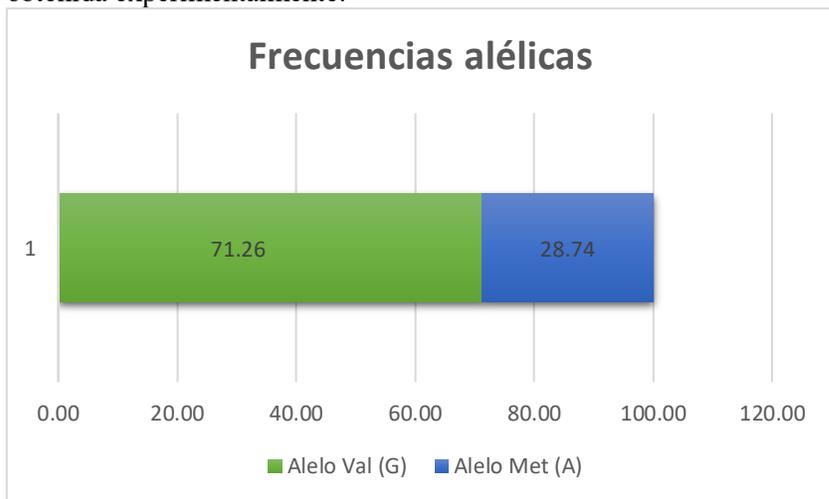
Tabla 6. Frecuencia alélica. Se muestra que las frecuencias alélicas son similares a las presentadas en otras poblaciones.

Alelo	A	G
Frecuencia (%)	28.74	71.26

De acuerdo con la tabla, podemos decir que, en comparación con la población peruana¹², en México, las frecuencias alélicas son muy similares, lo cual se debe al mestizaje español-nativo que, al igual que en Perú, presenta la gran mayoría de la población mexicana.

En la gráfica 3, se muestra una comparación entre las frecuencias alélicas obtenidas experimentalmente y para las cuales se encontró una χ^2 de 1.31.

Gráfica 3. Frecuencia alélica. Comparación de la frecuencia alélica obtenida experimentalmente.



8. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto y analizado, se concluye, que mediante el método de PCR-RFLP's se determinaron los genotipos homocigotos (Met /Met y Val /Val) y heterocigoto (Val / Met).

Asimismo, la frecuencia genotípica presenta una clara tendencia al heterocigoto Val/Met con una frecuencia de 49.6% de los casos analizados, de tal manera que la enzima codificada con mayor frecuencia, es la de actividad media para la población mexicana. En el caso de los homocigotos Met/Met y Val/Val, presentan una frecuencia de 3.9 y 46.5% respectivamente, las cuales son relativamente consistentes con las reportadas en distintas publicaciones y con las que observamos en el anexo 2 y 3, sin embargo, los resultados obtenidos indican que, al tratarse de una población mestiza, quedan en la mediana estadística a nivel mundial.

Las frecuencias alélicas del gen dopaminérgico COMT, encontradas en esta muestra, son cercanas a las señaladas para algunas poblaciones africanas, asiáticas, nativos norteamericanos, sudamericanos, y de Oceanía. Difieren principalmente de las informadas para el alelo Met.

Los resultados obtenidos en este proyecto, pueden ser utilizados en futuros estudios de asociación gen-enfermedad-farmacoterapia, puesto que el polimorfismo puede influir en el metabolismo de algunos fármacos de composición similar a las catecolaminas, lo que conlleva a un aumento o disminución en la dosis del fármaco dependiendo del tipo de enzima producida por el paciente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armero P, Muriel C, Santos J. Sánchez – Montero FJ, Rodríguez RE, González-Sarmiento R. (2004) Genetics Foundation of pain. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 11 444-451.
2. Brandan NC, Llanos IC, Ruiz D, Rodríguez AN. (2010) *Hormonas Catecolamínicas Adrenales.*
3. Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, et al. (2003, Julio) A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. *Am J Hum Genet.* 73(1):152-61
4. Brunton L. (2011) *Goodman y Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica.* 12ª edición. Mc Graw-Hill. México.
5. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. (2004, Noviembre) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet.* 75(5):807-21.
6. Craddock N, Owen MJ, O'Donovan M C. (2006, Mayo) The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Mol Psychiatry.* 11(5):446-58.
7. DeMille M, Kidd J, Ruggeri V, Palmatier M, Goldman D, Odunsi A, et al. (2002) Population variation in linkage disequilibrium across the COMT gene considering promoter region and coding region variation. *Human Genetics.* 111:521-37.
8. Floderus Y, Ross SB, Wetterberg L. (1981, Mayo) Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in a Swedish population. *Clin Genet* 19(5):389-92.
9. Florez J. (2003) *Farmacología humana.* 5ª edición ilustrada. Elsevier. España.
10. García-Fructuoso FJ. (2005) Procedimiento para la utilización del polimorfismo del gen COMT (catecol-oximetiltransferasa) en el pronóstico de la gravedad de la fibromialgia. *Boletín de la Propiedad Industrial.* 2:16.

11. García-Fructuoso FJ. (2006) Relación entre genotipos del gen COMT y la severidad de la fibromialgia. *Reumatología Clínica*.
12. Huerta D, Acosta O, Polo S, Martínez R, Oré R, Miranda C. (2007) Polimorfismo Val108/158 Met en el gen dopaminérgico catecol -o- metil transferasa (COMT) en una población mixta peruana y su importancia para los estudios neuropsiquiátricos. *An Fac Med Lima* 68(4). 321 – 327.
13. International Association for the Study of Pain. Subcommittee on Taxonomy. (1994) Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP press, Seattle.
14. Katzung B G, Masters AJT. (2013) *Farmacología Básica y Clínica*. 12ª edición. Mc Graw-Hill.
15. Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang HY, Strickland PT, Bell DA, Selmin O, et al. (1997, Diciembre) An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res*; 57(24):5493-7.
16. Luque J, Herráez A. (2006) *Biología molecular e ingeniería genética; Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Elsevier. España.
17. Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. (1999, Agosto) Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry*. 46(4):557-67.
18. Serra, J y Quíles-Bosque, C. (2003) *Antiepilépticos en el manejo del dolor neuropático*. Médica Panamericana.
19. Serra, J. y J. Peres. (1994) *Sensibilidad y su patología*. En: tratado de Neurología. Libro del Año.
20. The Allele Frequency Database, <http://alfred.med.yale.edu>
21. Tunbridge EM, Bannerman DM, Sharp T, Harrison PJ. (2004, Junio) Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. 24(23):5331-5.
22. Velázquez L.P. *Farmacología básica y clínica* (2003). Médica Panamericana. España.

23. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. (2003, Febrero) COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 299(5610):1240-3.

10. APÉNDICES

APÉNDICE A

Consentimiento informado.



Instituto de Seguridad
y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado



DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a ____ de _____ del 2011

Yo _____ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para ingresar al estudio titulado: "Estudio de los polimorfismos genéticos de *OPRM1* y *COMT*, y su relación con la percepción del dolor agudo postoperatorio y los requerimientos farmacológicos de la morfina para el control del dolor en pacientes oncológicos", como voluntario sano.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité de Investigación y de Ética en Investigación del Hospital CMN "20 de Noviembre ISSSTE", donde se realizará el estudio por un período aproximado de 3 años. Se me ha explicado que el propósito de dicho proyecto es analizar si algunas variantes genéticas están relacionadas con mayores requerimientos de analgésicos para el control del dolor o con una percepción aumentada del dolor. Estoy enterado que mi participación ayudará establecer la frecuencia de esas variantes genéticas en la población mexicana.

Para la realización de esta investigación se tomarán 5 ml de mi sangre, de la que se obtendrá DNA (las muestras se almacenarán en el laboratorio de Medicina Genómica bajo la responsabilidad de los investigadores responsables, por un periodo de 5 años, existiendo la posibilidad de utilizarlas posteriormente en otros estudios relacionados) y se buscará la presencia de algunos polimorfismos genéticos. También se me ha dado a conocer que existe un riesgo mínimo de hematoma y/o infección por la punción venosa que se realizará para obtener la muestra sanguínea, y se me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental.

Se espera que los resultados de esta investigación sean de utilidad para el tratamiento individualizado del dolor agudo en los pacientes oncológicos mexicanos. Los resultados agrupados que deriven del estudio podrán ser presentados en publicaciones y foros médicos, protegiendo la identidad de cada participante, ya que los datos obtenidos serán manejados de forma confidencial y anónima.

Nombre del paciente (o representante legal):

Firma:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo):

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del investigador:

Firma:

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar con la Dra. María del Carmen Chima G. en el siguiente número telefónico: (55) 52 00 50 03, extensión 14605 y 14507.

Y si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar con el Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité de Ética en Investigación a la extensión 14629 o con la Dra. Silvia García, Coordinadora de Investigación a la extensión 14609.

APÉNDICE B

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo V158M del gen COMT encontradas en la muestra peruana estudiada y las correspondientes a diferentes poblaciones del mundo. Basado en lo comunicado por Palmatier y col, DeMille y col y en la base de datos ALFRED.

Población	N	Frecuencias genotípicas		Frecuencias alélicas		
		Val/Val	Met/Val	Val (H o G)	Met (L o A)	
Peruanos, población mixta	106	0,42	0,51	0,07	0,68	0,32
Ticuna	67	-	-	-	0,78	0,22
Rondonian surui	46	-	-	-	0,70	0,30
Karitiana	55	-	-	-	0,99	0,01
Cheyenne	56	-	-	-	0,71	0,29
Pima Arizona	51	-	-	-	0,82	0,18
Maya Yucatán	53	-	-	-	0,45	0,55
Colombianos	168	0,78	0,20	0,02	0,88	0,12
Ghaneses	195	0,55	0,39	0,06	0,74	0,26
Kenianos	102	0,44	0,47	0,09	0,68	0,32
Rusos	48	0,29	0,40	0,31	0,49	0,51
Españoles	113	0,31	0,50	0,19	0,57	0,43
Caucásicos, Inglaterra	265	0,22	0,47	0,31	0,45	0,54
Caucásicos, EE UU	129	0,24	0,54	0,22	0,51	0,49
Caucásicos, Finlandia	35	-	-	-	0,47	0,53
Judios Ashkenazi	73	-	-	-	0,51	0,49
Melanesia	23	-	-	-	0,74	0,26
Micronesia	37	-	-	-	0,87	0,13
Asiáticos, suroeste	99	0,29	0,43	0,27	0,51	0,49
Taiwaneses	125	0,53	0,44	0,03	0,75	0,25
Japoneses	153	-	-	-	0,71	0,29
Chinos	98	0,67	0,30	0,03	0,82	0,18

APÉNDICE C.

Gráfico de frecuencias alélicas del polimorfismo V158M del gen COMT de la población peruana mixta estudiada, comparadas con las comunicadas para otras poblaciones del mundo.

