



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO RS4680 DEL GEN *COMT* POR PCR
EN TIEMPO REAL TETRA – PLEX EN PACIENTES MUJERES CON CÁNCER DE
MAMA

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Barrios Tapia, Carlos Enrique

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Robles Roman, Margarita Elena

Saez Flores, Gloria Maria

Pariona Llanos, Ricardo

Lima - Perú

2024



GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO RS4680 DEL GEN COMT POR PCR EN TIEMPO REAL TETRA – PLEX EN PACIENTES MUJERES CON CÁNCER DE MAMA

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
2	revistas.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	eprints.ucm.es Fuente de Internet	1%
4	worldwidescience.org Fuente de Internet	1%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
6	core.ac.uk Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1%
8	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
9	www.revistabionatura.com Fuente de Internet	<1%
10	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1%
11	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1%



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO RS4680 DEL GEN *COMT* POR PCR EN
TIEMPO REAL TETRA – PLEX EN PACIENTES MUJERES CON CÁNCER DE MAMA

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Barrios Tapia, Carlos Enrique

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Robles Roman, Margarita Elena

Saez Flores, Gloria Maria

Pariona Llanos, Ricardo

Lima - Perú

2024

Dedicatoria

A mis padres, Carlos y Lucía; a mis hermanas, Clarisa y Alepi, a Evelyn; y a quien sigue en nuestros pensamientos: Cloe.

Agradecimientos

Al gran equipo del Banco Nacional de Tumores, ya que, gracias a ellos, fue posible el desarrollo de mi tesis de pregrado. Al Dr. Sandro Casavilca por su acogida, mentoría y entusiasmo al escuchar nuevos proyectos. A Karina Cancino, por su gran apoyo en el desarrollo de mi tesis. A Ruddy Liendo, por sus consejos, los cuales llevo siempre presentes, así como por su asesoramiento y dedicación para la culminación de mi trabajo. Al profesor Ramsés Salas por la dedicación a sus estudiantes, por ser siempre un gran apoyo en mi formación profesional y el desarrollo de la presente. Al proyecto 102 – 2018/Fondecyt (ahora Prociencia) del CONCYTEC.

Una mención especial para Mauri, Brayam, Mequi, Jenny y Juanjo, quienes son los amigos que se hacen durante el camino.

ÍNDICE

RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Descripción y formulación del problema.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Objetivos.....	5
1.4 Justificación.....	5
1.5 Hipótesis.....	6
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	7
2.1.1. <i>Bases moleculares del gen y la enzima COMT.....</i>	<i>7</i>
2.1.2. <i>El polimorfismo funcional rs4680 del gen COMT.....</i>	<i>8</i>
2.1.3. <i>Participación del gen COMT en el ciclo de la dopamina a nivel molecular y proteómico.....</i>	<i>8</i>
2.1.4. <i>El gen COMT y su relación con enfermedades neurodegenerativas.....</i>	<i>9</i>
2.1.5. <i>El deterioro cognitivo asociado a quimioterapia en pacientes con cáncer de mama.</i>	<i>11</i>
2.1.6. <i>PCR en tiempo real.</i>	<i>13</i>
2.1.7. <i>PCR en tiempo real Tetra - Plex.</i>	<i>14</i>
III. MÉTODO	16
3.1 Tipo de investigación.....	16
3.2 Ámbito temporal y espacial.	16
3.3 Variables.....	16
3.4 Población y muestra.....	17
3.5 Instrumentos.....	17
3.6 Procedimientos.....	18
3.6.1. <i>Diseño de cebadores Tetra - Plex específicos.....</i>	<i>18</i>
3.6.2. <i>Obtención de controles positivos.....</i>	<i>18</i>
3.6.3. <i>Extracción de ADN genómico.....</i>	<i>19</i>
3.6.4. <i>Evaluación de calidad e integridad del ADN.....</i>	<i>20</i>
3.6.5. <i>Estandarización de la metodología de PCR en tiempo real Tetra - Plex.</i>	<i>21</i>
3.6.6. <i>PCR en tiempo real Tetra - Plex.....</i>	<i>22</i>

3.6.7. <i>Evaluación de la concordancia de la metodología de PCR en tiempo real Tetra - Plex</i>	23
3.6.8. Sensibilidad analítica.....	23
3.7 Análisis de datos.....	23
3.8 Consideraciones éticas.....	25
IV. RESULTADOS	26
4.1 Diseño de cebadores.	26
4.2 Obtención de controles positivos.....	30
4.3 Extracción de ADN genómico, evaluación de la calidad e integridad.....	32
4.4 Estandarización de la PCR en tiempo real Tetra - Plex.....	34
4.4.1. <i>PCR en tiempo real con reacciones independientes por alelo</i>	34
4.4.2. <i>PCR en tiempo real Tetra - Plex con gradiente de temperatura</i>	35
4.4.3. <i>Concentración de cebadores por reacción</i>	35
4.4.4. <i>Genotipificación de muestras de pacientes mediante PCR en tiempo real tetra - Plex</i>	38
4.4.5. <i>Concordancia de resultados con datos genéticos del Chip Affymetrix PMRA</i>	40
4.4.6. <i>Sensibilidad analítica</i>	41
4.4.7. <i>Ensayos de repetibilidad</i>	43
4.4.8. <i>Análisis de datos</i>	44
V. DISCUSION DE RESULTADOS	45
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIAS	52
IX. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Variables presentes en el proyecto.</i>	16
Tabla 2 <i>Programación del termociclador para la PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	21
Tabla 3 <i>Concentración de cebadores para la estandarización de la PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	22
Tabla 4 <i>Cebadores alelo no específicos diseñados.</i>	26
Tabla 5 <i>Tamaño y temperatura de melting de los amplicones alelo no específicos.</i>	27
Tabla 6 <i>Tamaño y temperatura de melting de los amplicones del alelo valina y metionina.</i>	28
Tabla 7 <i>Diferencias de Tm entre amplicones del polimorfismo rs4680 del gen COMT (OligoAnalyzer).</i>	28
Tabla 8 <i>Análisis in silico de la diferencia de Tm entre amplicones del polimorfismo rs4680 del gen COMT (uMelt Batch).</i>	29
Tabla 9 <i>Genotipificación de muestras control por PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	31
Tabla 10 <i>Componentes y concentraciones del Master Mix por reacción para la PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	40
Tabla 11 <i>Tasa de coincidencia entre 97 resultados genéticos del Chip Affymetrix PMRA y PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	40
Tabla 12 <i>Repetibilidad de resultados de genotipificación.</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Esquema representativo del sistema de mutación refractario a la amplificación utilizado en la PCR en tiempo real Tetra - Plex.</i>	15
Figura 2 <i>Fórmula de la prueba del Chi cuadrado.</i>	24
Figura 3 <i>Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Muestras del 1 al 31).</i>	32
Figura 4 <i>Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Muestras del 32 al 63).</i>	33
Figura 5 <i>Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Muestras del 64 al 101).</i>	33
Figura 6 <i>PCR en tiempo real con reacciones independientes por cada alelo.</i>	34
Figura 7 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores de 3 μM.</i>	36
Figura 8 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específico de 0.1 nM.</i>	37
Figura 9 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específicos de 0.5 μM.)</i>	37
Figura 10 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específicos de 0.28 μM.)</i>	38
Figura 11 <i>Protocolo de amplificación estandarizado para la PCR en tiempo real Tetra – Plex.</i>	39
Figura 12 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, 50 ng de ADN por reacción.</i>	41
Figura 13 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, 25 ng de ADN por reacción.</i>	42
Figura 14 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, 12.5 ng de ADN por reacción.</i>	42
Figura 15 <i>PCR en tiempo real Tetra – Plex, 6.25 de ADN por reacción.</i>	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Carta de aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación.....	62
Anexo B Aprobación del consentimiento informado del Banco de Tejidos Tumorales.	63
Anexo C Consentimiento Informado del Banco de Tejidos Tumorales.....	64
Anexo D Concentración y ratios de pureza de ADN extraído proveniente de pacientes mujeres con cáncer de mama.....	65
Anexo E Resultados de uMelt.	68
Anexo F Gradiente de temperatura de melting.....	70

RESUMEN

El polimorfismo rs4680 del gen catecol-O-metiltransferasa (COMT), implicado en la regulación de la degradación de catecolaminas, se ha asociado con el riesgo de deterioro cognitivo en pacientes con cáncer de mama con tratamiento de quimioterapia. Este estudio tuvo como objetivo determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4680 en muestras de ADN de pacientes mujeres con cáncer de mama, empleando una metodología basada en PCR en tiempo real Tetra-Plex. La metodología consistió en el diseño de cebadores específicos y en la optimización de la PCR en tiempo real Tetra-Plex. Se analizaron 97 muestras, se obtuvo una frecuencia genotípica de 0.5 para Val/Val, 0.39 para Val/Met y 0.11 para Met/Met, cumpliendo con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), con frecuencias alélicas de 0.691 para valina y 0.309 para metionina. Los resultados se validaron con el Chip Affymetrix PMRA, logrando una concordancia del 100% ($kappa = 1$). Los resultados muestran que la metodología optimizada de la PCR Tetra-Plex es eficaz, precisa y reproducible para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen COMT, destacándose como una herramienta útil para estudios de asociación genética y genotipificación en poblaciones peruanas con cáncer de mama.

Palabras clave: polimorfismo, rs4680, COMT, deterioro cognitivo, PCR en tiempo real

ABSTRACT

The rs4680 polymorphism of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene, involved in the regulation of catecholamine degradation, has been associated with the risk of cognitive impairment in breast cancer patients undergoing chemotherapy. This study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of the rs4680 polymorphism in DNA samples from female breast cancer patients, using a Tetra-Plex real-time PCR-based methodology. The methodology consisted of designing specific primers and optimizing Tetra-Plex real-time PCR. A total of 97 samples were analyzed, yielding a genotypic frequency of 0.5 for Val/Val, 0.39 for Val/Met, and 0.11 for Met/Met, conforming to Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$), with allelic frequencies of 0.691 for valine and 0.309 for methionine. The results were validated with the Affymetrix PMRA Chip, achieving a 100% concordance ($\kappa = 1$). The results indicate that the optimized Tetra-Plex PCR methodology is effective, precise, and reproducible for genotyping the rs4680 polymorphism of the COMT gene, highlighting it as a useful tool for genetic association studies and genotyping in Peruvian populations with breast cancer.

Keywords: polymorphism, rs4680, cognitive impairment, real time PCR.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema

Los polimorfismos de la enzima catecol – O – metiltransferasa (COMT) han sido ampliamente estudiados en el campo de la salud, desde su prevalencia en poblaciones, expresión diferencial del ARN mensajero según el genotipo de la enzima y en la relación con el cáncer de mama y deterioro cognitivo (Huang, et al., 1999; Huerta et al., 2007; Small et al., 2011; Zhu et al., 2004). El polimorfismo rs4680 (Val158Met) del gen *COMT* es el más asociado con las características fenotípicas de muchos desórdenes cognitivos de enfermedades neurodegenerativas (Dean et al., 2020; Khanthiyong et al., 2019; Mizuno et al., 2017; Sandoval y Ostrosky, 2012).

Además, se ha reportado que la presencia del alelo valina en el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, se relaciona con deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante en pacientes mujeres con cáncer de mama (Small et al., 2011). Considerando que el heterocigoto Val/Met del gen *COMT* es reportado como el genotipo más común en una población mixta peruana de personas sanas (51%), seguido del genotipo Val/Val (42%) y que el alelo más frecuente es valina con un 68%, se debe tomar especial interés en estudiar el polimorfismo en poblaciones que presenten enfermedades neurodegenerativas (Huerta et al., 2007).

Así mismo, el tratamiento de cáncer de mama con tamoxifeno, aromatasas, quimioterapia y radioterapia se ha asociado a deterioro cognitivo en hasta en un tercio de los pacientes; en consecuencia, se postula se deba a daño a nivel del ADN y la reparación del mismo con cambios neurodegenerativos (Casavilca-Zambrano et al., 2017). Estos cambios comunes y negativos a nivel cognitivo reportado por pacientes con cáncer que recibieron tratamientos con quimioterapia, es

conocido como “*Chemobrain*”. Este proceso se caracteriza por deterioro de la memoria, lenguaje, velocidad de procesamiento disminuida y déficit de atención (El-Agamy et al., 2019). Por lo mencionado anteriormente, el estudio del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* podría tener un rol importante en la salud cognitiva de este grupo poblacional de pacientes mujeres con cáncer de mama.

No obstante, para la detección o genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, a la fecha se emplea la reacción en cadena de la polimerasa de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés), como método más común y “*gold standard*”. Este se basa en una digestión enzimática por enzimas de restricción de un fragmento del gen previamente amplificado por PCR convencional. Sin embargo, esta metodología puede resultar costosa, neurotóxica por el empleo de poliacrilamida, de procedimiento largo y laborioso, debido a la complejidad de su estandarización y por uso de enzimas de restricción. En consecuencia, este estudio propone emplear la PCR en tiempo real Tetra – Plex, moderno método que se caracteriza por el empleo de 04 cebadores (02 alelo específico, que reconocerán específicamente la presencia o ausencia de la mutación y 02 alelo no específicos que amplificarán un fragmento mayor del gen que incluye el sitio de la mutación), permitiendo una genotipificación precisa, robusta, de bajo costo por la reducción de insumos, reactivos que puedan emplearse con otras técnicas como la PCR – RFLP. Además, presenta la capacidad de procesar un número elevado de muestras en corto tiempo.

1.2. Antecedentes

La información actual sugiere que los cambios en la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de los estrógenos, surgen debido a los polimorfismos rs4680 y rs4818 del gen

COMT. Se ha reportado una concentración diferencial de S-COMT en la corteza prefrontal, según el tipo de genotipo presente y a su vez, una alteración de receptores muscarínicos (Dean et al., 2020; Dean y Scarr, 2016; Parkin et al., 2018). Esta información puede explicar la estrecha relación que existe entre la proteína COMT y el deterioro de las funciones cognitivas en diferentes poblaciones vulnerables. A su vez, un estudio realizado por (Esmail et al., 2020), relaciona los alelos homocigotos de valina en la posición 158 del gen *COMT*, con cambios en la función cognitiva, denotando una concentración anormal de dopamina respaldado por electroencefalogramas también anormales que se relacionan con un aumento en la severidad del trastorno del espectro autista (ASD, por sus siglas en inglés). No obstante, el autor refuerza la necesidad de estudiar este polimorfismo en una población mayor y con un enfoque basado en haplotipos, ya que demuestran, preliminarmente, influenciar en el fenotipo cognitivo del trastorno del espectro autista.

La mayoría de metodologías de genotipificación reportadas en la literatura, se basan en la técnica de PCR-RFLP (Acosta, 2015; Huerta et al., 2007; Sandoval y Ostrosky, 2012), todas ellas con una visualización final en geles de poliacrilamida. Lajin y Alachkar (2011) optimizaron la técnica de PCR-RFLP, con un cebador *reverse* que contiene un *mismatch* con el ADN molde. De esta forma se obtiene un amplicón sin un segundo sitio de corte por la enzima de restricción, dejando solamente un sitio de corte de acuerdo al genotipo del gen *COMT* encontrado. En la literatura se encuentran métodos basados en espectrometría de masas (MassARRAY MALDI-TOF Sequenom iPLEX) (Dean et al., 2020; Dean y Scarr, 2016; Parkin et al., 2018), secuenciación del gen *COMT* previamente amplificado por PCR convencional (Esmail et al., 2020), detección por sondas *Taqman* (Small et al., 2011). Ojeda et al. (2014), desarrolló un ensayo combinando alelo específico y *melting* de alta resolución (*high resolution melting*, HRM) para la detección del gen

COMT de muestras de sangre periférica; mientras que, Ruiz-Sanz et al. (2007) desarrolló cebadores Tetra – Plex con sistema de mutación de amplificación refractaria para su detección con PCR convencional, seguido de una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para la visualización de las bandas.

Se ha reportado genotipificación de genes con polimorfismos por la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex, basado en el patrón de la temperatura de *melting* (*T_m*) por fluorescencia con SYBR *Green*. Con esta metodología, se pudo detectar adecuadamente el genotipo con cantidades de ADN de un rango de 100 ng a 0,1 ng, proveniente de diferentes tipos de muestras (sanguínea, tejido fresco, tejido parafinado), convirtiendo esta metodología en una muy sensible, precisa, económica y rápida forma de genotipificación (Baris et al., 2013).

En el Perú, Huerta et al. (2007) realizó el primer estudio sobre el polimorfismo rs4680 del gen *COMT* en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Determinó las frecuencias alélicas y genotípicas en una población mixta de 106 personas clínicamente saludables, peruanas, con edades que oscilaban entre los 18 y 50 años. Reportó que el alelo de más frecuencia es valina y el heterocigoto (Val/Met) es el genotipo más frecuente. Concluye que el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, en estudios de gen-gen y gen-medioambiente, debe ser considerado en los ensayos sobre genética neuropsiquiátrica, ya sea para poblaciones mixtas como nativas. Siguiendo con investigaciones realizadas en Perú, Acosta (2015), realizó un estudio de casos y controles en 50 pacientes con esquizofrenia, diagnosticados en el Hospital Hermilio Valdizán, y 150 controles clínicamente sanos. Para la genotipificación empleó una extracción de ADN proveniente de hisopado bucal, seguido de una PCR-RFLP y secuenciamiento automatizado para la confirmación.

No halló relación significativa de asociación. Concluye que es necesario un estudio en una mayor población, incluir estudios de ancestría, evaluar en conjunto de otros genes, entre otras observaciones.

1.3. Objetivos

-Objetivo General

Estimar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* mediante la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex en pacientes mujeres con cáncer de mama del INEN.

-Objetivos Específicos

Optimizar la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* en pacientes mujeres con cáncer de mama del INEN.

Evaluar la eficiencia de la PCR en tiempo real Tetra – Plex para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*.

1.4. Justificación

La calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama se ve afectada significativamente al conocer el diagnóstico de la enfermedad. Las pacientes pueden presentar diferentes síntomas psiconeurológicos, incluyendo depresión, trastornos del sueño, fatiga y deterioro cognitivo.

En este estudio se presenta el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, estudiado en pacientes mujeres con cáncer de mama, relacionado a un menor riesgo de deterioro cognitivo asociado a quimioterapia. Conocer la relación genética y clínica del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*,

daría paso a la implementación de tratamientos cognitivos previos, durante y después del tratamiento quimioterapéutico. En la actualidad, se conocen diferentes métodos de genotipificación para este polimorfismo, entre ellos: espectrometría de masas, secuenciación y PCR – RFLP. Sin embargo, las metodologías señaladas suelen ser costosas y de desarrollo laborioso. Con la finalidad de conocer y obtener una genotipificación precisa, robusta, de bajo costo y capaz de procesar numerosas muestras en corto tiempo para el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, se propone la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex. Esta metodología, no ha sido desarrollada previamente en estudios relacionados al gen *COMT* en el Perú ni en otros países (pero sí incluyendo otros polimorfismos). De tal modo que, una vez implementado, podría servir de modelo para otros polimorfismos asociados a diferentes problemas en diversas áreas de investigación en el Perú, dando paso a estudios más grandes que puedan emplear métodos sencillos.

1.5. Hipótesis

En pacientes mujeres con cáncer de mama del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas el genotipo heterocigoto Val/Met del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* es el más frecuente, seguido del genotipo homocigoto Val/Val y el homocigoto Met/Met.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1 Bases moleculares del gen y la enzima *COMT*

La proteína *COMT* fue descrita por primera vez por Axelrod en el año 1958 como una enzima que trasfiere un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM), al grupo hidroxilo en posición 3, de catecoles de estrógenos y catecolaminas para su degradación (Axelrod y Tomchick, 1958). La proteína *COMT* es una enzima con actividad metil transferasa (EC 2.1.1.6) que se expresa en varios órganos de los mamíferos como el hígado, riñón y cerebro.

Haciendo uso de sondas de ADN en ratones, se conoció la ubicación del gen *COMT* humano en el brazo largo del cromosoma 22, banda 11.1 (22q11.1). Su secuencia posee 6 exones, siendo los 2 primeros no codificantes para la proteína. El gen tiene un tamaño de 1.6 kb (kilobases) y dos sitios promotores para dos diferentes isoformas: una forma soluble (S – *COMT*) y una unida a la membrana (MB – *COMT*) (Männistö y Kaakkola, 1999).

Las isoformas MB y S – *COMT*, cuya masa molecular es de 30,0 y 24,8 KDa, respectivamente, tienen una expresión diferencial en el cerebro, ya que MB – *COMT* se expresa en un 70% del tejido mencionado y tiene una afinidad 100 veces mayor por la dopamina que S-*COMT* (Grossman et al., 1992). También la expresión de MB – *COMT* ha sido encontrada y estudiada en 16 regiones cerebrales del sistema nervioso central, donde se expresa mayormente en la médula espinal (Hong et al., 1998).

2.1.2 El polimorfismo funcional rs4680 del gen COMT.

La enzima COMT presenta un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés) en el codón 158. Hay una sustitución de guanina por adenina (G>A), que se traduce a una metionina, en lugar de valina, dando lugar al polimorfismo rs4680 del gen *COMT* (Lachman et al., 1996).

Este polimorfismo presenta tres fenotipos dependiendo del genotipo de los alelos: Val/Val codifica una alta expresión de la enzima COMT, Val/Met para una expresión media y Met/Met para una expresión baja, siendo, también, este fenotipo un punto de estudio para el riesgo a desarrollar cáncer de mama por su baja actividad enzimática que se relaciona con una mayor presencia de estrógenos (Lavigne et al., 1997). Los alelos homocigotos de metionina dan como resultado a una enzima muy termolábil, debido a la hidrofobicidad de este aminoácido, viéndose reflejado en una enzima que se degrada muy sencillamente a 37°C (Lotta et al., 1995).

2.1.3 Participación del gen COMT en el ciclo de la dopamina a nivel molecular y proteómico.

La dopamina se sintetiza a partir de tirosina y fenilalanina, en las terminales nerviosas dopaminérgicas, participando la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (L - DOPA descarboxilasa). Tiene efecto sobre neuronas post - sinápticas a través de la interacción con receptores de dopamina 1 (D1) y receptores de dopamina 2 (D2) acoplados a proteína Gs que, al ser activados, libera Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) como mediador de la transducción de señales. Las enzimas COMT y monoamino-oxidasa participan en la degradación de la dopamina, produciendo ácido dihidrofenilacético y 3-metoxitiramina, que son productos intermedios de la degradación, siendo el ácido homovalínico (HVA) un producto final,

cuando no es recaptado hacia las terminales nerviosas. Si la dopamina es captada nuevamente hacia el interior de las terminales nerviosas, es convertida en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), luego es liberado para convertirse en HVA (Dunlop y Nemeroff, 2007; Ricardo y Arias-Montaño, 1999).

En un estudio realizado en ratones con genes silenciados, entre los que estaban el gen *COMT* y el transportador de dopamina de alta afinidad (DAT), concluyeron que, en los ratones que tenían el gen *COMT* silenciado, la dopamina demoraba dos veces más en ser eliminada en la corteza prefrontal, a comparación de los ratones sin el gen silenciado (Käenmäki et al., 2010). También la enzima COMT tiene una expresión diferencial de sus isotipos en el cerebro y pueden afectar la expresión de otras proteínas, como los receptores muscarínicos 1. A su vez, se discute la posibilidad de que S - COMT, al no estar en el espacio extracelular, se encargue de degradar los precursores de la dopamina como L - DOPA (Dean et al., 2020; Parkin et al., 2018).

2.1.4 El gen *COMT* y su relación con enfermedades neurodegenerativas.

(Bowden et al., 1997) en una investigación realizada en el Reino Unido, cuantificó la concentración de dopamina y metabolitos de dopamina como DOPAC, que principalmente tiene origen intraneuronal; y HVA, que se sintetiza de manera extraneuronal, estudiado en cerebros *post mortem* de personas que padecían depresión con diagnóstico confirmado. El autor discute una asociación entre un reducido recambio de dopamina según sus metabolitos estudiados y la depresión, sin embargo, no presentó una evidencia clara para su relación por presentarse distintos factores que pudieron interferir en sus resultados como el uso de antidepresivos.

Mientras que, Massat et al. (2005), examinó la relación entre el polimorfismo rs4680 del gen *COMT* y el inicio temprano de desórdenes en el estado de ánimo de una población europea

(menor o igual de 25 años), encontrando una relación significativa con el trastorno depresivo mayor para el homocigoto de valina. No obstante, se discute que los resultados no tienen relación con estudios previos mencionados por el autor, y que la asociación pueda deberse a un desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo causal diferente en su cercanía. El autor resalta el rol pleiotrópico del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* en la susceptibilidad y sintomatología de los trastornos neuropsiquiátricos; y sugiere un estudio en diferentes poblaciones basado en una metodología de asociación familiar.

Es importante mencionar el estudio de (Huerta et al., 2007), que realizó sobre una población mixta peruana de 106 personas, enfocado a conocer las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo val108/158met. Dio a conocer que el genotipo más frecuente es el heterocigoto Val/Met y valina como el alelo más frecuente. La autora recomienda tener conocimiento de los genotipos tanto para poblaciones mixtas como nativas y tener presente dicho valor para estudios posteriores relacionados a genética neuropsiquiátrica.

Utilizando la resonancia magnética para analizar la fisiología de la corteza prefrontal de los pacientes mientras realizaban pruebas N-Back (activando la corteza prefrontal dorsolateral), Egan et al. (2001) demuestra una activación diferente de acuerdo al genotipo de la enzima COMT, siendo principalmente activada en pacientes con el genotipo Val/Val, lo que se interpreta como un mayor déficit cognitivo. El autor menciona que dicho polimorfismo, el cual no está presente en primates no humanos, es una ventaja evolutiva relacionada con el cerebro humano. El trabajo termina concluyendo que quizá el polimorfismo no esté estrechamente relacionado con la esquizofrenia, sin embargo, está comprometido con la biología de la enfermedad y su función prefrontal.

2.1.5 El deterioro cognitivo asociado a quimioterapia en pacientes con cáncer de mama.

La quimioterapia es uno de los tratamientos que se opta para diversos tipos de cánceres, que puede mejorar la esperanza de vida de los pacientes tratados. Sin embargo, este tratamiento trae consigo efectos secundarios como náuseas, diarreas, pérdidas de peso, vómitos, entre otros (Wakiuchi et al., 2019).

El deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante, en muchos casos es notado por las mismas pacientes que luego de haber recibido el tratamiento, notan cambios en sus habilidades cognitivas como la atención, concentración, memoria, trastornos visuales, de memoria semántica, aprendizaje y coordinación motora, a dichos cambios se les ha asignado el término anglosajón de “*chemobrain*” o “*chemofog*”, representando los trastornos cognitivos mencionados (López-Santiago et al., 2015; Guevara et al., 2013).

(Rubio et al., 2009) explica que también el deterioro cognitivo se puede presentar de manera leve en un porcentaje variable de pacientes que reciben el tratamiento. Comenta que sería de gran importancia tener una batería de pruebas neuropsicológicas con la suficiente especificidad y sensibilidad para detectar el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante, y con esto implementar un programa de rehabilitación cognitiva para las pacientes que denoten dicha patología. El deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante que se presenta de forma leve, también es comentado por (López-Santiago et al., 2011), el autor hace mención que, al ser sutil, puede desaparecer con el tiempo, sin embargo, en algunos casos puede traer consigo graves secuelas. También el autor da una observación sobre estudios en modelos animales, neuroimagen y electrofisiología que sirven para desentrañar su mecanismo de acción. Finaliza comentando que

el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante puede presentar manifestaciones únicas en cada individuo, debido a las características psicosociales y genéticas que pueda presentar.

En Colombia, Bonilla et al. (2016) evaluó los procesos cognitivos en 14 pacientes mujeres con cáncer de mama, después que recibieron tratamiento con quimioterapia, comparado con un grupo control. Teniendo como resultado diferencias significativas en la memoria de trabajo y evocación entre ambos grupos. El autor finaliza mencionando que las pacientes que tuvieron el tratamiento de quimioterapia, a comparación del grupo control, presentó un menor rendimiento relacionado a la memoria verbal, con mayores intrusiones lo cual representa afecciones en dicho proceso.

(Casavilca-Zambrano et al., 2017). hace una primera revisión en el Perú sobre el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia y resalta la importancia de generar una base de datos científicos para poder tener un panorama más amplio del tema en nuestro país. El autor menciona que es necesario entender el proceso biológico por el cual se ocasiona el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante y la investigación de marcadores moleculares, siendo de mucha utilidad a la hora de escoger un tratamiento más especializado para las pacientes con cáncer de mama.

Entre los mecanismos de acción que pueden influenciar en el deterioro cognitivo está el daño oxidativo del ADN acortamiento de los telómeros, cambios hormonales, respuesta inflamatoria, neurotransmisión alterada y polimorfismos genéticos de reparación neuronal (Buskbjerg et al., 2019; Dempster et al., 2006; Muniyandi et al., 2018; Ren et al., 2019).

La predisposición génica relacionada a los polimorfismos de reparación neuronal, representa un interesante campo de estudio para esta patología. El deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante se ha visto más afectado cuando, además de lo mencionado, se presenta

un factor genético asociado como el polimorfismo rs4680 del gen *COMT*. Small et al. (2011) estudió el genotipo Val del gen *COMT* (Val/Val, Val/Met contra Met/Met) en mujeres blancas de Estados Unidos, que tuvieron tratamientos de quimioterapia, radioterapia y un grupo control. Las mujeres que tuvieron ambos tratamientos, demostraron tener un menor rendimiento en las pruebas cognitivas que el grupo control. Los portadores del alelo valina obtuvieron un peor desempeño en pruebas de atención, motricidad y fluidez verbal, a comparación del alelo metionina. Para las mujeres que recibieron tratamientos de quimioterapia y presentaban el alelo valina, obtuvieron resultados muchos más bajos con respecto a las mujeres que no tuvieron historial de cáncer, para las pruebas de atención. Esto demuestra que el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia puede ser visto más afectado cuando se encuentra junto a un factor de riesgo génico (*COMT*-Val).

2.1.6 PCR en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa, técnica desarrollada por Kary Mullis, se basa en la amplificación de un fragmento de un gen miles de veces (amplicones), por moléculas específicas que participan en dicha reacción. Tales como los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), que sirven como bloques para la nueva síntesis del amplicón; *Taq* polimerasa, como una enzima con un rol fundamental, sintetizando la nueva hebra del ADN en sentido 5' → 3'; Mg^{2+} , un catión divalente que es empleado como cofactor por la enzima *Taq* polimerasa; tampón de reacción, sales y cebadores, que flanquean el extremo blanco en el ADN molde, dependiendo de ellos el tamaño del amplicón deseado (Mullis, 1990; Pinilla et al., 2008).

En la PCR se distinguen 3 fases, en las que la temperatura varía con el propósito de igualar el proceso de replicación que ocurre en una célula normal: denaturación (93 – 95 °C), hibridación

(dependiente de la temperatura de *melting* de los cebadores) y extensión (dependiente de la temperatura de elongación de la *Taq* polimerasa, generalmente 72 °C) (Mas et al., 2001).

Una variante de la PCR, es la PCR en tiempo real, que se basa en la fluorescencia emitida por algún agente fluorogénico, sea intercalante del ADN como SYBR Green o una sonda como Taqman. El SYBR Green se une al ADN de doble hebra, siendo este principio una limitante, debido a que también se unirá de forma no específica a todas las secuencias de ADN bicatenario, tales como dímeros de *primers* o productos inespecíficos. Por este motivo, se requiere una posterior evaluación de la curva de *melting* para la eliminación de patrones o curvas de amplificación que puedan interferir en los resultados. Por otro lado, las sondas Taqman, son más específicas ya que son oligonucleótidos que se hibridan con el ADN monocatenario y tienen la capacidad de emitir fluorescencia si son escindidos por la *Taq* polimerasa al momento de la elongación (Cao y Shockey, 2012).

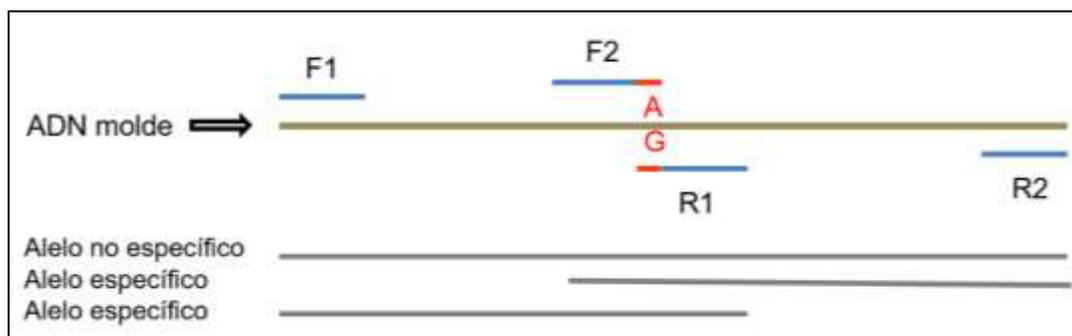
2.1.7 PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Esta técnica ha sido descrita como un procedimiento eficiente, económico y muy sensible para genotipificación de SNPs (Lajin y Alachkar, 2011). Se basa en el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS, por sus siglas en inglés), análisis de la curva de *melting* y PCR en tiempo real por SYBR green. El éxito de esta metodología se debe a la presencia de 2 pares de cebadores que se emplean en la reacción: 2 cebadores alelo específicos, que contienen en el extremo 3' un nucleótido complementario de acuerdo sitio polimórfico; además de un *mismatch* en la posición – 2 del extremo 3', que brinda mayor especificidad para unión del cebador a la cadena molde de ADN (ver Figura 1). Los otros dos cebadores, son de alelo no específico, ya que, amplificarán una región que no determina la presencia o ausencia del polimorfismo y, por lo

general, el amplicón es de mayor tamaño. Al obtener siempre este amplicón en todas las reacciones, se puede considerar como un control interno de amplificación. Al final de cada ciclo se evalúa la fluorescencia y se construye una curva de *melting* que se corresponderá con la temperatura de *melting* de los amplicones para así poder genotipificar el polimorfismo deseado (Lajin y Alachkar, 2011; Little, 1995; Ye et al., 2001). Partiendo del fundamento del alelo específico (ARMS) se han desarrollado varios estudios para determinar el genotipo de diversos polimorfismos, no obstante, la posibilidad de unir la metodología de ARMS con PCR en tiempo real, genera resultados mucho más confiables, reproducibles, rápidos, de bajo costo y en un solo paso (Lajin y Alachkar, 2011; Mohd et al., 2016; Najmabadi y Teimourian, 2001; Riccardi et al., 2014).

Figura 1

Esquema representativo del sistema de mutación refractario a la amplificación utilizado en la PCR en tiempo real Tetra - Plex.



III. MÉTODO

3.1. Tipo de Investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo retrospectivo experimental.

3.2. Ámbito temporal y espacial

La presente investigación se desarrolló entre los meses de enero del año 2023 a enero del año 2024. El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Banco de Tejidos Tumorales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), en el distrito de Surquillo, región Lima.

3.3. Variables

Tabla 1

Variables presentes en el proyecto.

Tipo de variable	Variable
Independiente	Cebadores diseñados específicamente.
	Temperatura de <i>annealing</i>
	Concentración de cebadores. Concentración de ADN por reacción. Alineamiento de cebadores.
Dependiente	Genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen <i>COMT</i> .
	Límite de detección.

3.4. Población y muestra

Está conformado por 101 muestras de ADN genómico de pacientes mujeres con cáncer de mama. El número de muestras a estudiar se encuentran en función a los criterios de inclusión y exclusión del protocolo INEN 17 – 79.

3.5. Instrumentos

Equipos:

Termomixer (Eppendorf), Vortex MX-S (Dlab), NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific™), MiniSpin Plus (Eppendorf), Cabina de PCR Isocide (Esco), termociclador CFX96 (Bio-Rad).

Reactivos:

Kit para extracción de ADN (High Pure PCR Template Preparation Kit Roche), isopropanol (Merk), agua destilada UltraPure™ (Invitrogen), cebadores específicos para el gen COMT, iQ Sybr Green Master Mix (Bio-rad).

Insumos:

Tubos de 1.5 mL para microcentrífuga (Eppendorf), micropipetas 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL (Eppendorf), puntas descartables para micropipeta Maximum Recovery 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL (Axygen) y racks de plástico para tubos de 1.5 mL.

3.6. Procedimientos

3.6.1 *Diseño de cebadores Tetra – Plex específicos.*

Se diseñaron en base a cebadores propuestos anteriormente por Ruiz – Sanz (2007) para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* (GenBank ID: 1312) mediante el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS, por sus siglas en inglés) con una posterior modificación por el programa en línea Primer 3 Plus (disponible en línea: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) de los cebadores alelo no específicos, para su implementación en la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex. Se mantuvo la secuencia de los cebadores alelo específicos, de igual manera, el *mismatch* incorporado en la posición – 2 del extremo 3', el cual incrementa la especificidad de estos cebadores. La especificidad de los cebadores fue evaluada por los programas en línea BLAST (disponible en línea: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y PrimerBLAST (disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

El cálculo de la T_m de los cebadores y amplicones fue realizado por las herramientas en línea OligoAnalyzer™ Tool (disponible en línea: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y OligoCalc (disponible en línea: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

3.6.2 *Obtención de controles positivos*

Se extrajo ADN genómico (procedimiento según el subtítulo 3.6.3 del presente documento) de muestras sanguíneas de 10 pacientes mujeres con cáncer de mama. Se evaluaron las concentraciones y las proporciones (260/280 y 260/230) de pureza por espectrometría. Las

muestras fueron analizadas en ciego, para obtener una discriminación crítica del genotipo resultante.

Las muestras de ADN genómico fueron genotificadas mediante un procedimiento extenso de PCR en tiempo real con reacciones separadas de cebadores, siguiendo el programa que se indica en la Tabla 3. Los parámetros de la reacción que se utilizaron fueron establecidos en función al manual del fabricante del kit iQ Sybr Green Master Mix (Bio-Rad).

Los genotipos obtenidos de las muestras control, se compararon y validaron con datos genéticos obtenidos de la genotificación de las muestras mediante el análisis con el chip Affymetrix PMRA (Precision Medicine Research Array) ~900,000 SNPs.

Se utilizó 1 muestra como control positivo por cada genotipo (Val/Met, Val/Val y Met/Met) en las reacciones de PCR en tiempo real Tetra – Plex.

3.6.3 Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit High Pure PCR Template Preparation de la marca Roche.

Se utilizó 200 µL de sangre total (previamente congelada a -80°C) para la extracción de ADN genómico, se añadió 200 µL de buffer de lavado, 40 µL de Proteinasa K, se homogenizó inmediatamente y se incubó a 70°C por 10 minutos (min). Terminada la incubación, se agregó 100 µL de isopropanol previamente refrigerado y se homogenizó por vortex.

Todo el contenido se traspasó a una columna con un filtro de alta pureza. Se centrifugó a 8 000 gravedades (g) por 1 minuto, se descartó y se reemplazó el tubo colector. Se adicionó 300 µL del buffer removedor de inhibidores y se centrifugó a 8 000 g por 1 min, se eliminó el tubo

colector y se reemplazó por uno nuevo. Se añadió 500 µL de buffer de lavado y se centrifugó a 8 000 g por 1 min (este paso se repitió dos veces más). Después de las repeticiones con el buffer de lavado, se centrifugó por 14 segundos a máxima velocidad para eliminar restos del buffer que hayan podido quedar en el filtro de alta pureza de la columna. Para concluir, se introdujo la columna dentro de un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 mL y se dejó con la tapa abierta a temperatura ambiente por 5 min para eliminar restos de alcohol de los buffers de lavado. Posteriormente, se adicionó 50 µL de buffer de elución en el centro del filtro (sin tocar el filtro), se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8 000 g por 1 min. El ADN obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

3.6.4 Evaluación de calidad e integridad del ADN.

El ADN aislado fue cuantificado en NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) para conocer las concentraciones y las proporciones 260/280 y 260/230. Para la evaluación de la integridad del ADN, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X. La visualización de las bandas se realizó por medio de un transiluminador de luz azul.

3.6.5 Estandarización de la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex.

3.6.5.1. Reacción de PCR en tiempo real Tetra –Plex con controles positivos. Las estandarizaciones y genotipificaciones de la PCR en tiempo real Tetra – Plex para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, fueron realizadas con el Kit iQ™ SYBR® Green Supermix, el cual contiene dNTPs, ADN polimerasa iTaq, MgCl₂, SYBR Green, potenciadores, estabilizantes de la reacción y fluorencina. Se utilizará el termociclador CFX96 (Bio-Rad).

Se realizó la PCR en tiempo real en reacciones separadas para cada alelo (Val, Met y alelo no específico) y los pares de cebadores correspondientes, empleando los controles positivos, con la finalidad de determinar las curvas y temperaturas de *melting* experimentales. La medición de la fluorescencia se realizó al término de cada ciclo del programa. Luego de estos pasos, la construcción de la curva *melting* fue realizada a una temperatura inicial de 82 °C, seguido de un aumento de 0,1 °C por segundo, hasta alcanzar una temperatura final de 90 °C. Los parámetros que se proponen utilizar en el termociclador se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Programación del termociclador para la PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo	ciclos
Denaturación	95	4 min	1
Denaturación	95	20 s	
Alineamiento	58	30 s	30
Extensión	30	20 s	
Final	12	10 min	infinito

Nota. La construcción de la curva de melting fue desarrollada aumentando la temperatura de 75 °C a 95 °C, con un intervalo de 0.1°C por segundo.

Después de conocer las curvas y temperaturas de *melting* experimentales, se realizó la PCR en tiempo real Tetra – Plex con los controles positivos, con la inclusión de los 04 cebadores.

3.6.5.2. Gradiente de temperatura y temperatura de *melting*. Se determinó la temperatura óptima de amplificación mediante PCR en tiempo real Tetra – Plex con gradiente de temperatura de alineamiento, desde 54 a 62 °C (con intervalos de 2 °C), evaluando la curva de *melting* y el valor de la unidad de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés).

3.6.5.3. Concentración de cebadores por reacción. Con la finalidad de obtener curvas de *melting* definidas y sin solapamiento, se evaluó la concentración de cebadores óptima, modificando las concentraciones de cada cebador desde 0,1 µM hasta 0,3 µM, así como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Concentración de cebadores para la estandarización de la PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Cebadores	Mix 1 (µM)	Mix 2 (µM)	Mix 3 (µM)	Mix 4 (µM)	Mix 5 (µM)
Forward 1	3	0,1	0,05	0,28	0,2
Forward 2	3	3	3	3	3
Reverse 1	3	3	3	3	3
Reverse 2	3	0,1	0,05	0,28	0,2

3.6.6 PCR en tiempo real Tetra – Plex

Los parámetros y cliclaje del termociclador se muestran en la Tabla 2, además de una construcción de las curvas de *melting* por incremento de la temperatura 0,1°C/s desde 75°C hasta 95°C.

Luego de obtener la concentración adecuada de cebadores, curvas de *melting* y temperatura de *melting* de los alelos Val, Met y alelo no específico, se genotipificaron las muestras de ADN genómico de 101 pacientes mujeres con cáncer de mama, mediante PCR en tiempo real Tetra –

Plex. No obstante, para el análisis final se consideraron 97 muestras, debido a que 04 muestras no presentaron resultados genéticos del Chip Axiom PMRA.

3.6.7 Evaluación de la concordancia de la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex..

Los resultados de los genotipos del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* obtenidos por PCR en tiempo real Tetra – Plex, fueron comparados con los resultados de la genotipificación por el Chip Axiom PMRA ~900,000 SNPs, el cual fue considerado como *Gold Standard* para evaluar la concordancia. Los datos del Chip fueron analizados mediante el Software Bioinformático Plink 1.9 (disponible en línea: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) por el lenguaje de programación R (RStudio) (disponible en línea: <http://www.rstudio.com/>). Con esta información, se obtuvo la tasa de coincidencia (valor *Kappa*) y eficacia de la metodología PCR en tiempo real Tetra – Plex.

3.6.8 Sensibilidad analítica

Para evaluar la sensibilidad analítica o límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés), se realizó una dilución en serie de 12 muestras de ADN (09 muestras de pacientes diferentes y 03 controles positivos de cada genotipo, evaluadas por triplicado) con agua ultra pura de PCR, obteniendo diferentes cantidades finales por reacción (50; 25; 12,5 y 6,25 ng) para la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex.

3.7. Análisis de datos

Las reacciones de PCR en tiempo real Tetra – Plex se realizaron por triplicado para garantizar la robustez de la metodología.

Los genotipos resultantes se anotaron manualmente en una base de datos del programa Excel (Microsoft Office). Se calcularon las frecuencias genotípicas, alélicas y el equilibrio de Hardy – Weinberg (HWE, por sus siglas en inglés) por el *software* genético GenAlex 6.5 (disponible en línea: <https://biology-assets.anu.edu.au/GenALEx/Download.html>), paquete multiplataforma del programa Excel. Para los análisis mencionados, se consideró lo siguiente:

$$p^2 + 2(pq) + q^2;$$

p^2 = Alelos homocigotos de individuos con genotipo G (Val)

$2(pq)$ = Alelos heterocigotos G y A (Val/Met)

q^2 = Alelos homocigotos de individuos con genotipo A (Met)

Para calcular la prueba del Chi cuadrado (X^2) (valor de significancia de $p > 0.05$; grados de libertad, $g.l = 1$) se utilizó la fórmula mostrada en la Figura 2.

Figura 2

Fórmula de la prueba del Chi cuadrado.

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

Nota. X^2 , Chi cuadrado; O, valor observado; E, valor esperado.

3.8. Consideraciones éticas

Las muestras de sangre total cuentan con autorización para la conservación e investigación científica mediante la firma del consentimiento informado (CI) (ver Anexo C.). El protocolo INEN 17 – 79, está aprobado por el Comité Institucional de Ética del INEN (CIEI) (Ver Anexo A). Así mismo, el CI cuenta con la aprobación del CIEI (Ver Anexo B). Las muestras fueron codificadas manteniendo la confidencialidad del paciente.

IV. RESULTADOS

4.1. Diseño de cebadores

Por el programa en línea *Primer 3 Plus* (Untergasser et al., 2007), se obtuvieron 4 pares de cebadores alelo no específicos. Se calculó la temperatura de *melting* por dos programas: OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer, RRID:SCR_001363) y OligoCalc (Tabla 4).

Tabla 4

Cebadores alelo no específicos diseñados.

Grupo	Tipo de cebador	Secuencia (5' – 3')	Longitud del Cebador (pb)	Tm °C (OligoAnalyzer)	Tm °C (OligoCalc)
1	Forward 1	cccggccATCGAGATCAACCCCGA CTGTG	29	75.6	66.8
	Reverse 2	GCCTGGTGATAGTGGGTTTTCA GTG	25	68.3	57.5
2	Forward 1	ATCGTGGACGCCGTGATTCAGG	22	69.8	59
	Reverse 2	GGGCCTGGTGATAGTGGGTTTT	22	68.1	54.5
3	Forward 1	ATCGTGGACGCCGTGATTCAGG	22	69.8	59
	Reverse 2	GTGGGTTTTTCAGTGAACGTGGT G	23	67.3	55
4	Forward 1	GGCATCACCATCGAGATCAACC	22	66.4	55
	Reverse 2	GCCTGGTGATAGTGGGTTTTCA GTG	25	68.3	57.5

El porcentaje de GC se encontró en un rango de 59 – 62, siendo este número el permitido para tener un diseño apropiado de cebadores (40 – 60%); no obstante, el cebador *forward 1* tuvo un porcentaje de GC de 65.5. El análisis de la especificidad de los cebadores alelo no específicos

diseñados, muestra un 100% de identidad y cobertura para el gen *COMT* humano. Así mismo, todos los cebadores presentan un extremo 3' complementario a la cadena molde de ADN.

El valor –E de los cebadores analizados por BLAST, mostraron un valor máximo de 0.088 para el cebador *forward* 1 del grupo 1; mientras que el valor mínimo fue de 0.003 para el cebador *reverse* 2 del grupo 2.

Se obtuvo una similitud del 100% con el análisis del programa en línea BLAST de los cebadores individuales en la secuencia del gen *COMT* de los siguientes organismos: *Pan paniscus*, *Hylobates Moloch*, *Gorilla gorilla* y *Nomascus leucogenys*. No obstante, el análisis por Primer–BLAST de los grupos de cebadores alelo no específicos (*forward* y *reverse*), demostró la presencia única de amplicones del gen *COMT* humano. El tamaño de los amplicones y las temperaturas de *melting* se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Tamaño y temperatura de melting de los amplicones alelo no específicos.

Grupo	Tamaño de amplicón (pb)*	Tm °C (OligoAnalyzer)	Tm °C (OligoCalc, Nearest Neighborg)
1	202	75.3	85
2	317	64.8	88
3	304	66	88
4	204	75.5	85

*pb: pares de bases

Se evaluaron las temperaturas de *melting* de cada amplicón en función del alelo valina y metionina (Tabla 6); así mismo, se analizaron las diferencias entre sus temperaturas de curva de *melting* de los amplicones del alelo valina y metionina. (Tabla 7).

Tabla 6

Tamaño y temperatura de melting de los amplicones del alelo valina y metionina.

Grupo	Tamaño de amplicón Val (pb)*	Val Tm °C (OligoAnalyzer/OligoCalc)	Tamaño de amplicón Met (pb)	Met Tm °C (OligoAnalyzer/OligoCalc)
1	90	82.5 / 82.95	159	78.7 / 82.95
2	203	74.6 / 88.31	161	78.6 / 88.31
3	203	74.6 / 88.31	148	79.4 / 88.31
4	90	82 / 82.09	159	78.7 / 82.09

*pb: pares de bases.

Tabla 7

Diferencias de Tm entre amplicones del polimorfismo rs4680 del gen COMT (OligoAnalyzer).

Grupo	Diferencia teórica de temperatura de <i>melting</i> (°C)	
	Met y Val	Val y el alelo no específico
1	3.8	7.2
2	4	9.8
3	4.8	8.6
4	3.3	6.5

Para la elección de cebadores en base a la diferencia de temperatura de las curvas de *melting* de los amplicones, se consideró un valor mínimo de 1 °C.

Los valores teóricos obtenidos en la Tabla 7 fueron mayores a 1 °C para todos los casos; no obstante, los resultados muestran valores muy distantes (3.3 – 7.2 °C de diferencia) y, posiblemente, no utilitarios para la elección de cebadores, por lo que se utilizó el programa en línea uMelt Batch (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>) para evaluar *in silico* las curvas de

melting de cada amplicón, en una simulación de PCR en tiempo real con 03 amplicones diferentes (Tabla 8).

Tabla 8

Análisis in silico de la diferencia de Tm entre amplicones del polimorfismo rs4680 del gen COMT (uMelt Batch).

Grupo	Diferencia teórica de temperatura de <i>melting</i> (°C)	
	Met y Val	Val y el alelo no específico
1	2	1
2	2.5	0
3	2.5	0
4	2.5	1

Los resultados de la tabla 8 evidenciaron que los grupos 2 y 3 de cebadores no presentaron diferencias de temperaturas entre los amplicones Val y alelo no específico, por lo tanto, se descartaron del grupo de candidatos de cebadores. Los grupos 1 y 4, presentaron una diferencia de 1 °C entre los amplicones Val y alelo no específico; mientras que, la diferencia entre los amplicones Met y Val fue de 2 y 2.5, respectivamente. Las figuras correspondientes al análisis *in silico* se muestran en el Anexo E.

La evaluación de la formación de estructuras secundarias (*hairpin* y dímeros de cebadores), reveló un ΔG negativo en todos los casos, no excediendo el valor de -10 Kcal/mol. El valor más bajo presentado fue de -1.98, con una T_m de 48 °C para el cebador *forward* 1 del grupo 1. Para la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex, se eligieron los grupos de cebadores 1 y 4, no obstante, en los ensayos de PCR en tiempo real Tetra – Plex, el grupo 1 de cebadores presentó una alta amplificación inespecífica, correspondiente a dímeros de cebadores con una curva de *melting*

de 84 °C, coincidiendo con la curva de *melting* de metionina. Por lo tanto, los siguientes análisis mostrados fueron realizados empleando el grupo 4 de cebadores.

4.2. Obtención de controles positivos

Se realizó una extracción de ADN de 10 muestras controles (con genotipos conocidos) provenientes de sangre total de pacientes con cáncer de mama. Se analizó la concentración, ratios de pureza e integridad, obteniendo resultados acordes a los criterios de elegibilidad de las muestras. Las muestras controles se genotificaron en ciego mediante PCR en tiempo real Tetra Plex, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 9.

Tabla 9

Genotipificación de muestras control por PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Muestra	Genotipo
	PCR en tiempo real Tetra – Plex
001C	V/M
049C	V/M
015C	V/V
010C	V/V
059C	M/M
035C	V/M
006C	V/V
081C	V/M
016C	V/V
018C	M/M
Tasa de coincidencia	
Gold standard (Chip Affymetrix PMRA)	100% (<i>Kappa</i> = 1)

Nota. V/M=valina/metionina, V/V=valina/valina, M/M=metionina/metionina

La liberación del ciego para la comprobación de los resultados de genotipificación de las muestras controles, evidenció una tasa de coincidencia del 100% (*Kappa* = 1), según los resultados genéticos del Chip Affymetrix PMRA (Precision Medicine Research Array) ~900,000 SNPs. Se eligieron a los controles 001C (heterocigoto), 015C (homocigoto de valina) y 059C (homocigoto de metionina), para los siguientes ensayos.

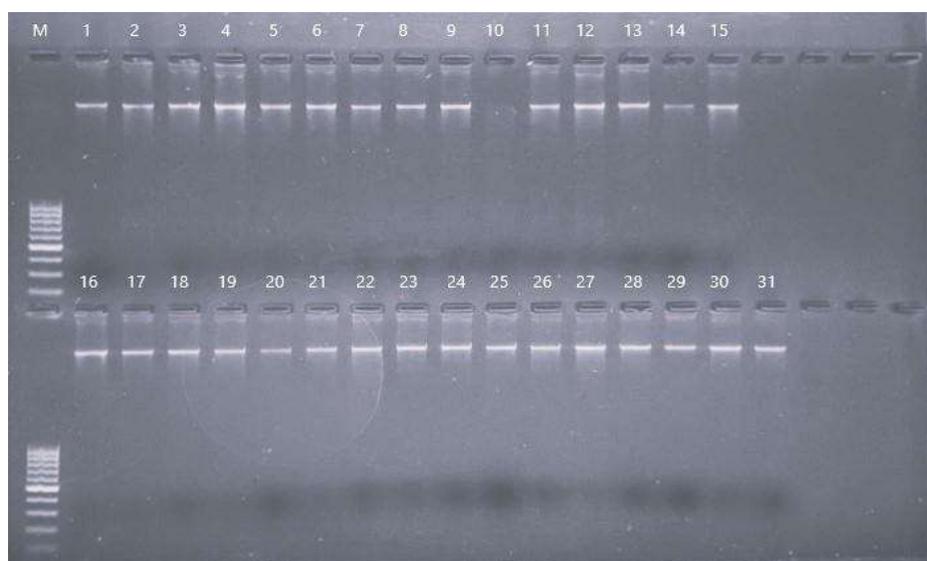
4.3. Extracción de ADN genómico, evaluación de la calidad e integridad.

Se extrajo ADN genómico de 101 muestras de pacientes mujeres con cáncer de mama, siguiendo el protocolo del kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). La evaluación de la concentración y proporciones de pureza se muestra en el Anexo D. Se analizó la integridad por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X (Figura 3).

Las muestras cumplieron con los criterios de elegibilidad en función a su calidad estructural y química.

Figura 3

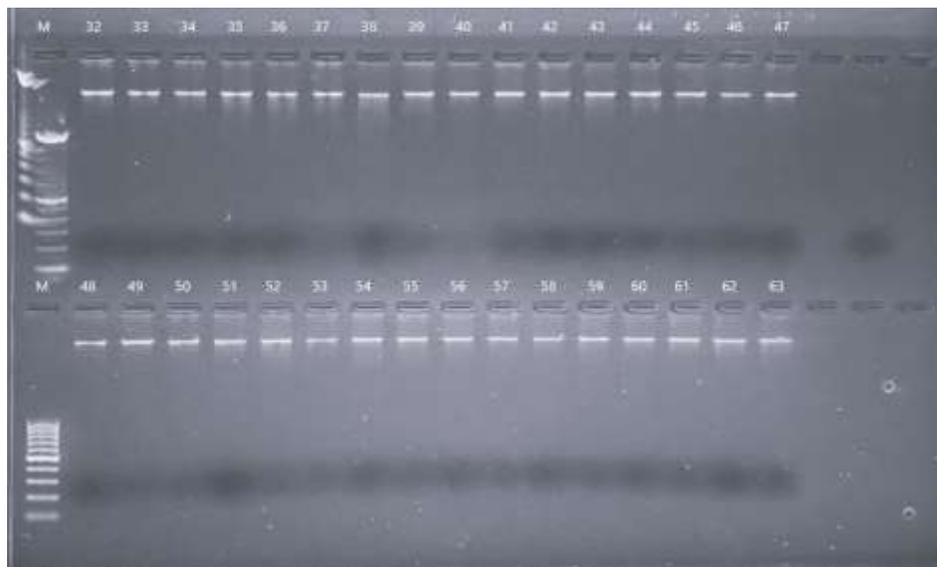
Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Muestras del 1 al 31.



Nota. M; marcador de 100 pares de bases.

Figura 4

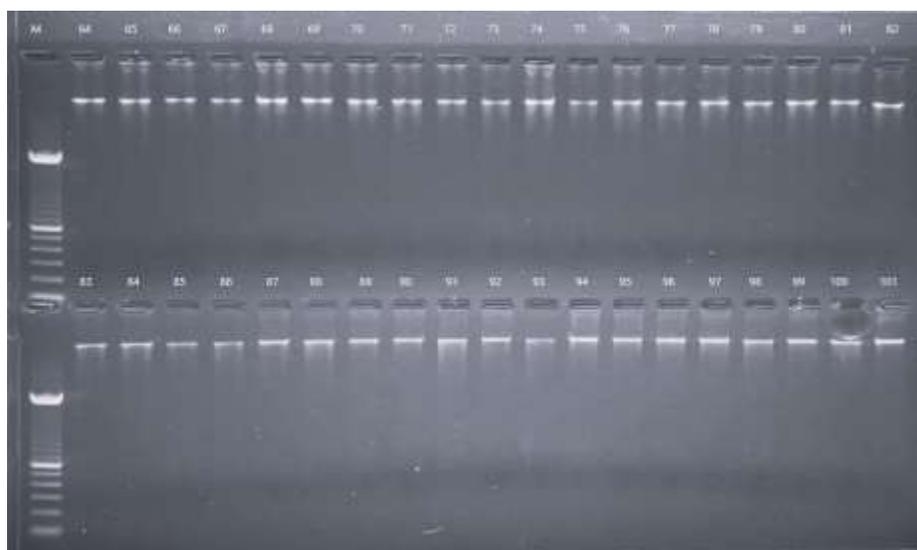
Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Muestras del 32 al 63).



Nota. M; marcador de 100 pares de bases.

Figura 5

Fotografía de Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Muestras del 64 al 101).



Nota. M; marcador de 100 pares de bases.

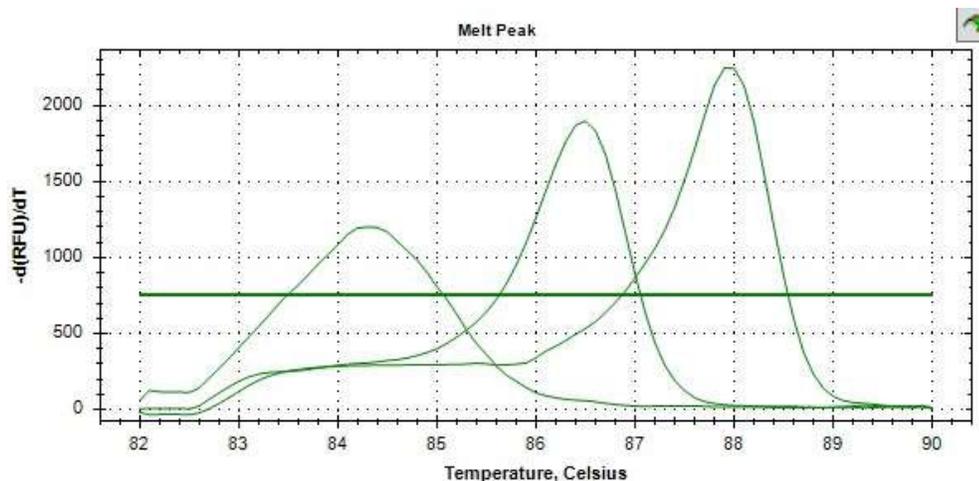
4.4. Estandarización de la PCR en tiempo real Tetra – Plex.

4.4.1 PCR en tiempo real con reacciones independientes por alelo.

Se realizó una PCR en tiempo real en base a los controles positivos de cada genotipo. Las reacciones fueron desarrolladas con el objetivo de amplificar alelos independientes (Val, Met y alelo no específico) y conocer su curva y temperatura de *melting* real.

Figura 6

PCR en tiempo real con reacciones independientes por cada alelo.



Nota. Metionina, 84 °C; valina, 86 °C y alelo no específico, 88 °C (orden de izquierda a derecha).

Imagen obtenida del análisis en el software Maestro (BioRad).

Las temperaturas de *melting* de los amplicones del alelo específico metionina, valina y el alelo no específico se encontraron entre 83.9 – 84.3, 86.1 – 89.8 y 87.5 – 88.1 °C, respectivamente. Se observó una correcta separación de cada curva de *melting* para los alelos de metionina, valina

y alelo no específico; no obstante, las temperaturas del amplicón valina y alelo no específico se encontraron cercanas. Lo mencionado fue exhibido al realizar la PCR en tiempo real Tetra – Plex con la inclusión de los 04 cebadores, donde se observó un solapamiento del amplicón valina por el alelo no específico (Figura: la primera de gradiente, que muestre con 0.5 uM).

4.4.2 PCR en tiempo real Tetra – Plex con gradiente de temperatura.

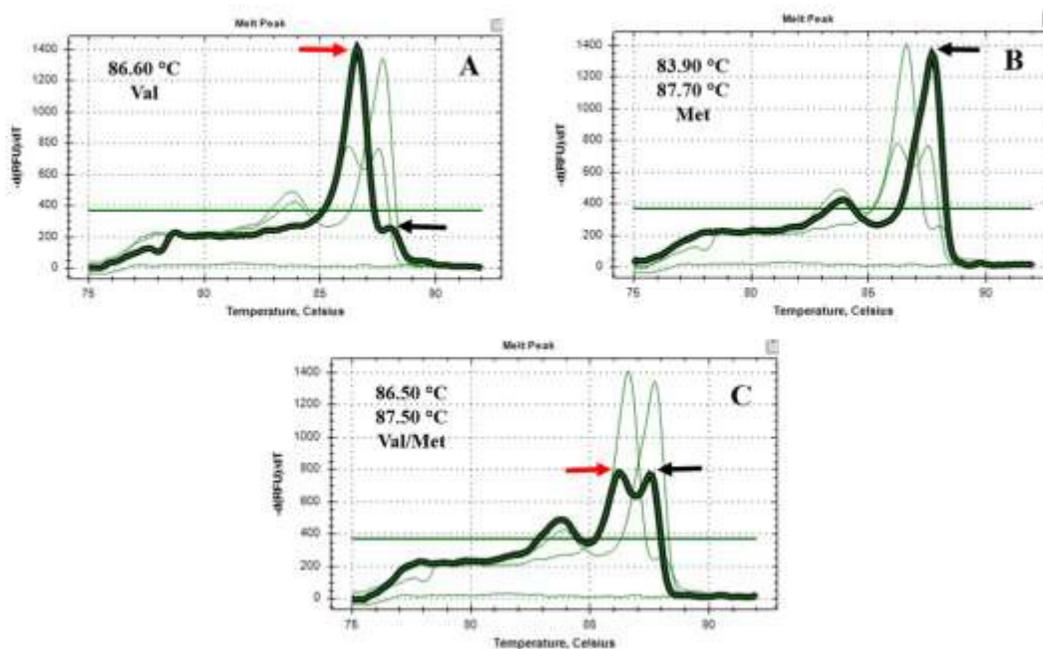
Para obtener una curva de *melting* definida y evitar la formación de productos inespecíficos de amplificación, se realizó una gradiente de temperatura para la PCR en tiempo real Tetra – Plex (62, 63, 64, 65,2 y 66,2 °C). La temperatura óptima elegida para el estudio fue de 64 °C, así mismo, se obtuvo mayor fluorescencia para el amplicón Met, según los valores del RFU (Anexo F).

4.4.3 Concentración de cebadores por reacción

Se realizó una PCR en tiempo real Tetra – Plex utilizando una concentración de 3 µM por cada cebador Tetra – Plex. Los resultados se visualizan en la Figura 7.

Figura 7

PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores de 3 μ M.

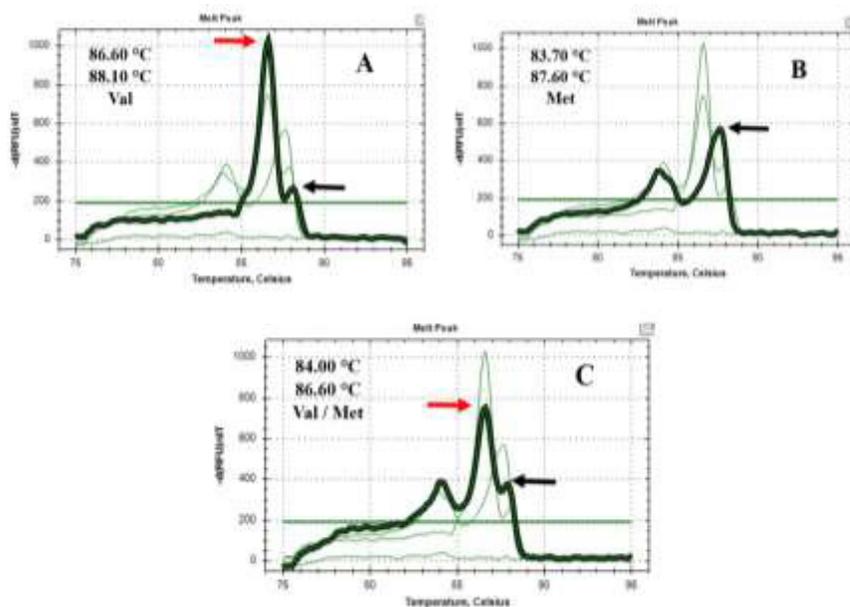


Se observó que el amplicón del alelo Val no es visible debido al solapamiento ocasionado por el amplicón del alelo no específico (Fig. 8B y 8C).

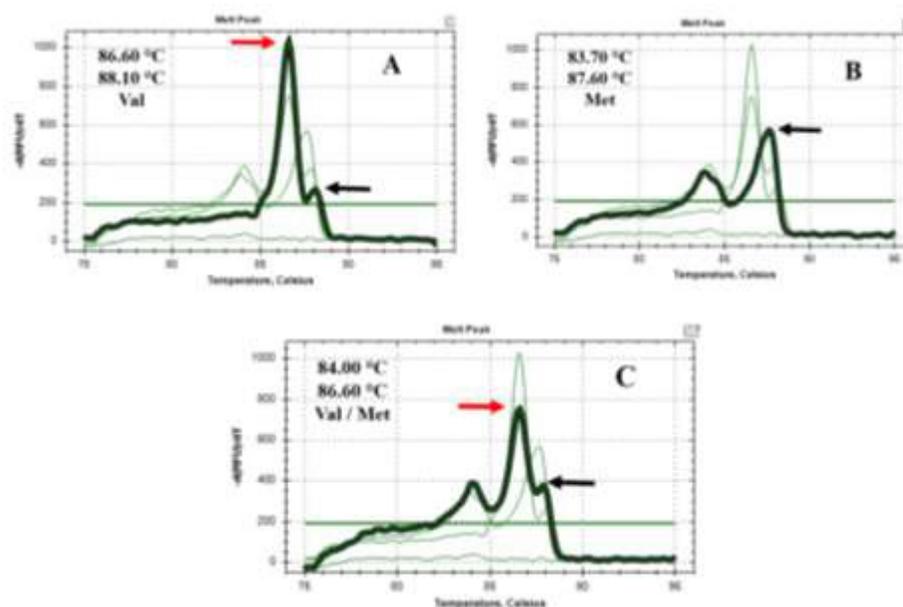
Con la finalidad de obtener una correcta discriminación de los genotipos, se disminuyó la concentración de los cebadores alelo no específicos (1.0, 0.1, 0.05, y 0.028 nM), manteniendo la concentración de cebadores específicos (0.3 nM) (Figura 8, 9 y 10).

Figura 8

PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específico de 0.1 nM.

**Figura 9**

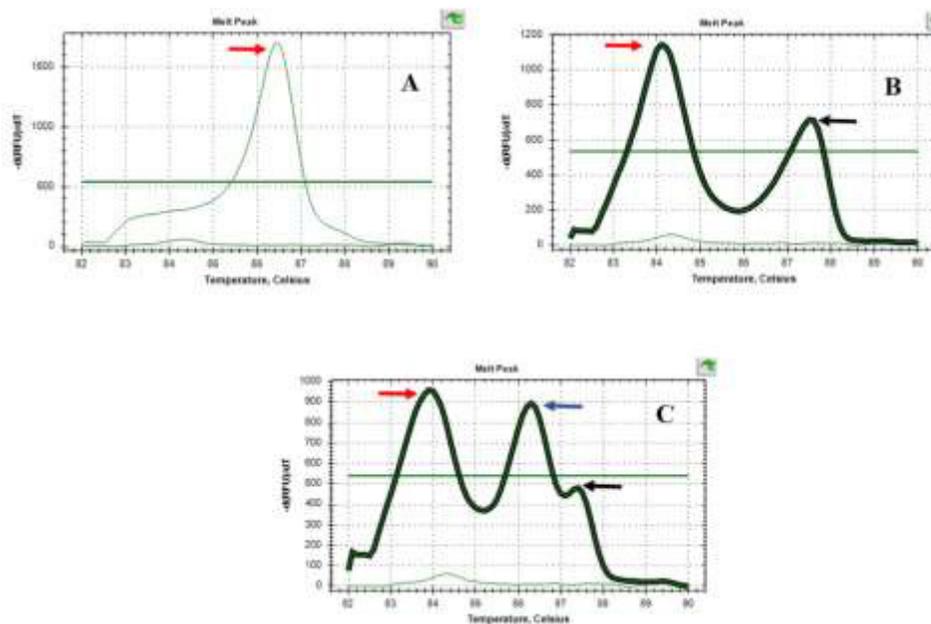
PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específicos de 0.5 μ M.



Nota. Pico de melting de valina (flecha roja) y pico de melting del alelo no específico (flecha negra).

Figura 10

PCR en tiempo real Tetra – Plex, concentración de cebadores alelo no específicos de 0.28 μM .



Nota. Pico de melting de valina (flecha roja), pico de melting de metionina (flecha azul) y pico de melting del alelo no específico (flecha negra).

Para una concentración de 0.028 μM , se redujo la amplificación del amplicón alelo no específico. Esta modificación dio como resultado una clara visualización del alelo Val (Fig. 10C). Por consiguiente, se obtuvo 01 amplicón para el genotipo homocigoto Val, 02 para el genotipo homocigoto Met y 03 para el genotipo heterocigoto Val/Met.

4.4.4 Genotipificación de muestras de pacientes mediante PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Las muestras de ADN provenientes de 77 pacientes mujeres con cáncer de mama fueron genotipificadas por duplicado mediante PCR en tiempo real Tetra – Plex. Los resultados de la

genotipificación se muestran en la Tabla 11. La información derivada del proceso de estandarización fue empleada en la formulación de un protocolo de amplificación destinado al termociclador, así como en la determinación de las concentraciones apropiadas para la elaboración del *Master Mix* para la reacción de PCR en tiempo real Tetra – Plex (Fig. 11 y Tabla 10).

Figura 11

Protocolo de amplificación estandarizado para la PCR en tiempo real Tetra – Plex.

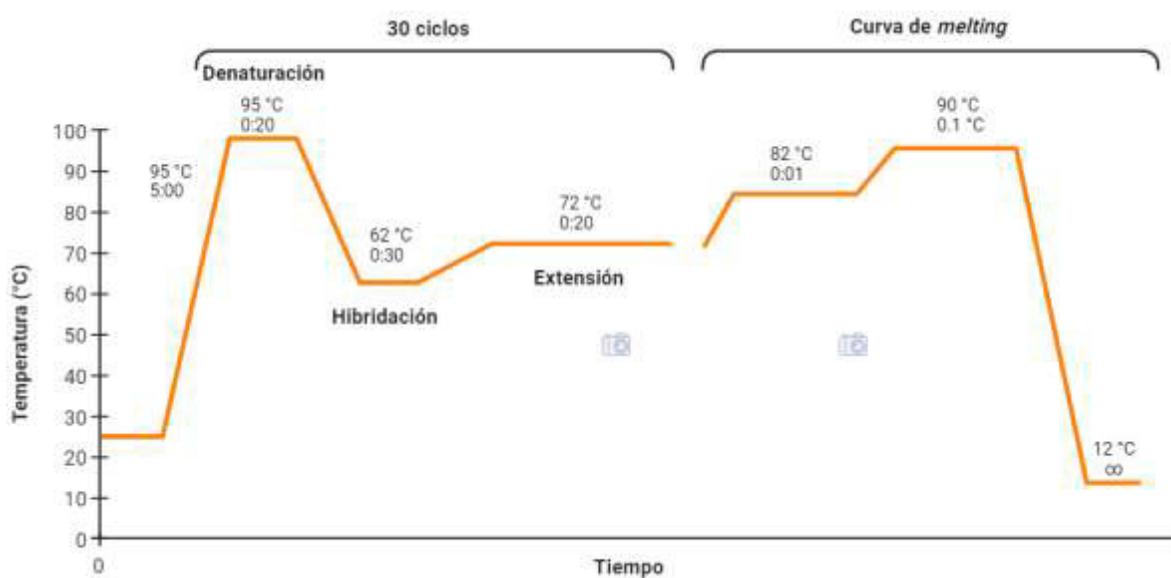


Tabla 10

Componentes y concentraciones del Master Mix por reacción para la PCR en tiempo real

Tetra – Plex.

Componentes	Volumen (μL) x1 reacción	Concentración final (μM)
Buffer 2x iQ Sybr Green	10	1x
Forward 1 (3.75 μM)	1.5	0.281
Reverse 1 (30 μM)	2	3
Forward 2 (30 μM)	2	3
Reverse 2 (3.75 μM)	1.07	0.2
H ₂ O PCR	1.43	-
ADN (25 ng/ μL)	2	50 ng
Volumen final	20	-

4.4.5 Concordancia de resultados con datos genéticos del Chip Affymetrix PMRA

Para la evaluación de la concordancia de los resultados se comparó la tasa de coincidencia, considerando el valor *Kappa* (*k*) (Cohen's kappa value) entre los resultados del Chip Affymetrix PMRA (*gold standard*) y del PCR en tiempo real Tetra – Plex. Los resultados mostraron una tasa de coincidencia del 100% para las 97 muestras analizadas con un valor *Kappa* de 1.

Tabla 11

Tasa de coincidencia entre 97 resultados genéticos del Chip Affymetrix PMRA y PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Metodologías	Genotipos (97)		
	V/V	M/M	V/M

Affymetrix PMRA	48	11	38
PCR en tiempo real Tetra - Plex	48	11	38
Tasa de coincidencia	100% ($Kappa = 1$)		

4.4.6 Sensibilidad analítica

Se desarrolló la metodología considerando 4 cantidades finales de ADN genómico (50, 25, 12.5 y 6.25 ng) para cada reacción. Se determinó que es posible identificar correctamente el genotipo a una cantidad final de 12.5 ng de ADN (Fig. 14), mientras que, a 6.25 ng, esta discriminación se vio perjudicada (Fig. 15). Para una mejor identificación y para evitar confusiones al evaluar las curvas de *melting* de cada genotipo, se consideró utilizar una cantidad total de 50 ng por reacción, tal como se puede visualizar en la figura 12.

Figura 12

PCR en tiempo real Tetra – Plex, 50 ng de ADN por reacción.

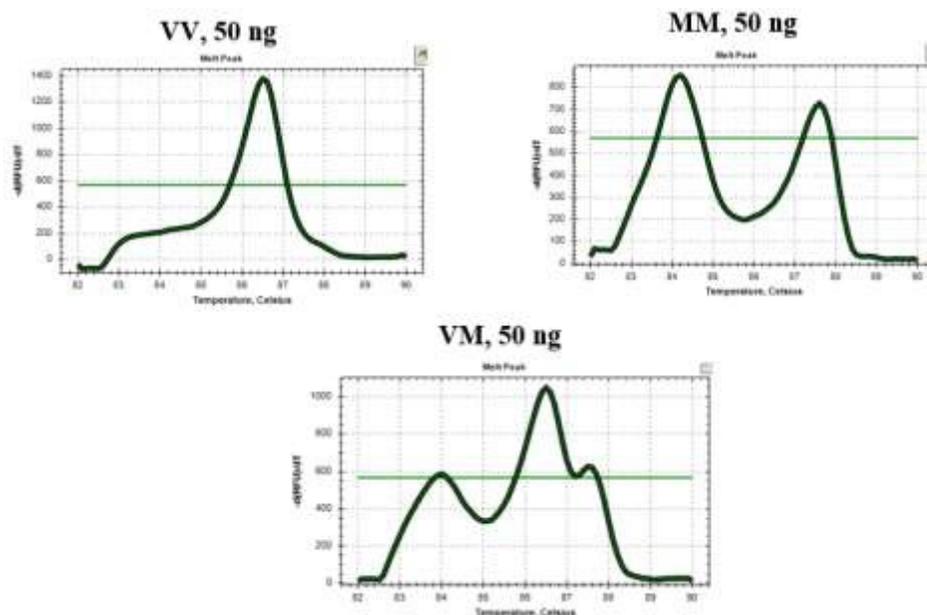


Figura 13

PCR en tiempo real Tetra – Plex, 25 ng de ADN por reacción.

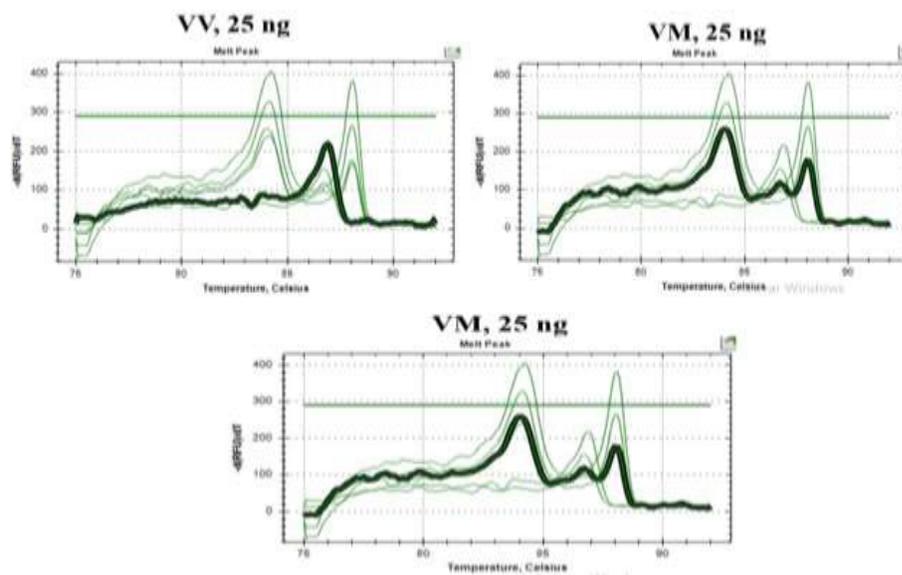


Figura 14

PCR en tiempo real Tetra – Plex, 12.5 ng de ADN por reacción.

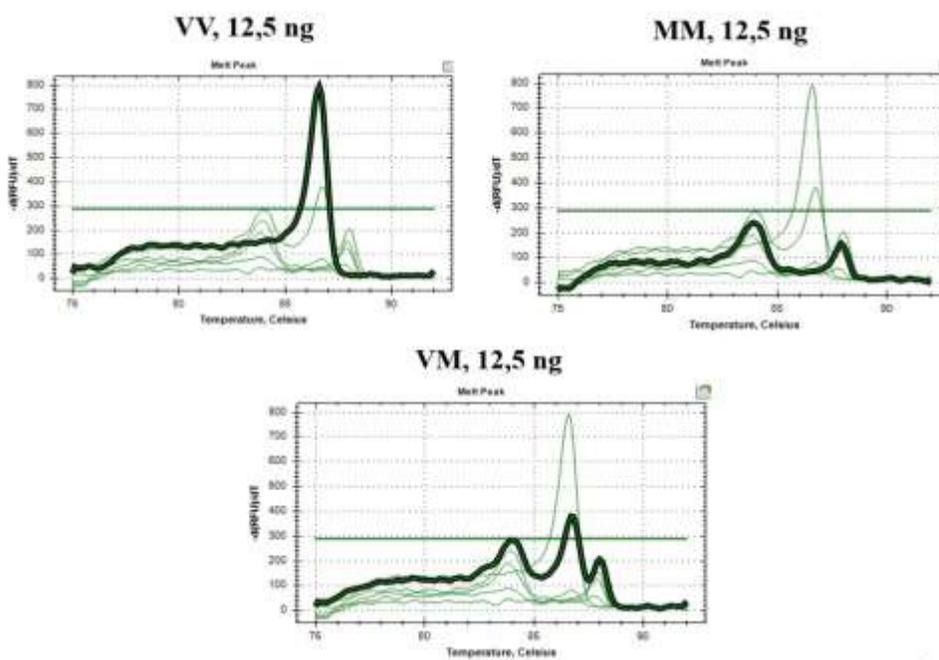
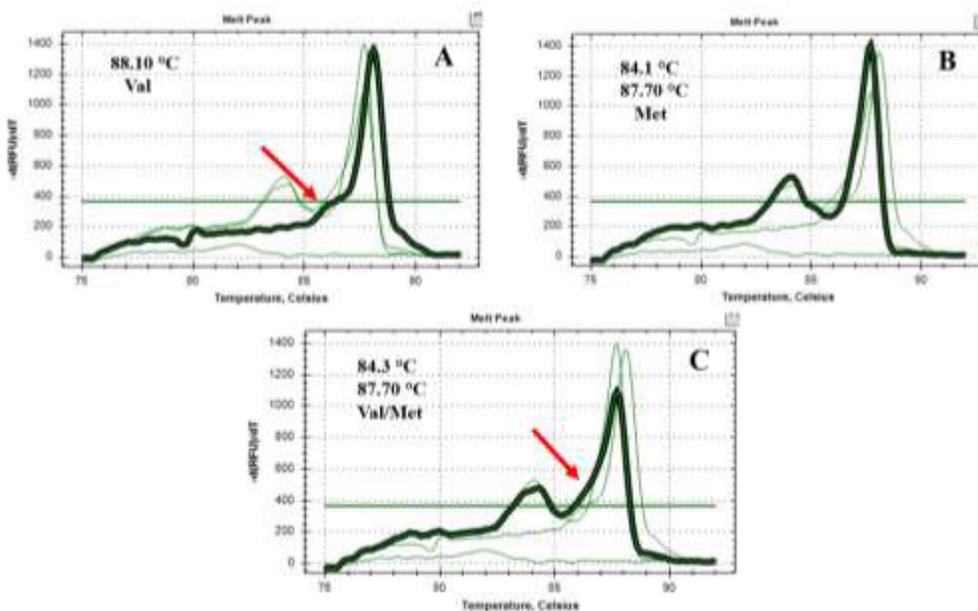


Figura 15

PCR en tiempo real Tetra – Plex, 6.25 de ADN por reacción.



4.4.7 Ensayos de repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad de los resultados de la PCR en tiempo real Tetra – Plex, se genotificaron 20 muestras, cada una por duplicado y por separado (10 por cada programa del termociclador) y se repitieron siguiendo el mismo esquema de duplicados. Posteriormente, las 20 muestras se corrieron en bloque, obteniendo los mismos resultados.

Los resultados fueron comparados con la información genética del Chip Affymetrix, coincidiendo al 100% ($Kappa = 1$). Para cada genotipo se obtuvo una temperatura de *melting* de 84.1 ($SD \pm 0.12$) para metionina, 86.54 ($SD \pm 0.15$) para valina y 87.7 ($SD \pm 0.13$) para el alelo no específico, las cuales se mantuvieron durante el estudio. Asimismo, los controles elegidos para cada genotipo (Tabla 9), mostraron una alta repetibilidad a lo largo de todo el estudio.

Tabla 12*Repetibilidad de resultados de genotipificación.*

Metodologías	Genotipos (20)		
	V/V	M/M	V/M
Affymetrix PMRA	9	0	11
PCR en tiempo real Tetra - Plex	9	0	11
Tasa de coincidencia	100% (<i>Kappa</i> = 1)		

Nota. La genotipificación fue realizada por duplicado para cada muestra y se hicieron dos corridas de PCR para corroborar la repetibilidad.

4.4.8 Análisis de datos

Se calcularon las frecuencias genotípicas, alélicas y el HWE de los resultados de la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT* por PCR en tiempo real Tetra – Plex en 97 muestras (se incluyeron 20 muestras adicionales utilizadas en el ensayo de repetibilidad), mediante *software* genético GenAlex 6.5 (grados de libertad, $g.l = 1$).

Se determinó una frecuencia genotípica de 0.5 para Val/Val, 0.39 para el genotipo Val/Met y 0.11 para el genotipo Met/Met. La comparación de las frecuencias esperadas con las observadas, permitió identificar que la población se encuentra en el equilibrio de Hardy –Weinberg ($X^2 = 0.670$; $p > 0.05$). El alelo más frecuente (frecuencia alélica) fue valina, con un valor de 0.691; mientras que, el alelo metionina presentó un valor de 0.309.

V. DISCUSION DE RESULTADOS

Es de importancia pública y médica el comprender, analizar y determinar factores de riesgo que puedan ocasionar mayores agravios en la salud de pacientes con cáncer de mama. Una problemática actual viene representada por el deterioro cognitivo asociado a quimioterapia adyuvante, que ha sido mayormente estudiada en esta población vulnerable y que, en esta investigación, se estudió el factor genético relacionado al polimorfismo rs4680 del gen *COMT*. Se postula que este polimorfismo actúa como un factor protector en su forma genotípica de Met/Met; mientras que, la forma genotípica Val/Val, asociada a una mayor capacidad catalítica de dopamina, ocasiona un mayor riesgo del deterioro cognitivo asociado a quimioterapia (Egan et al., 2001; Käenmäki et al., 2010; Yang et al., 2019).

El presente estudio tuvo como objetivo analizar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4680, empleando una metodología basada en PCR en tiempo real – ARMS; por lo tanto, se diseñaron cebadores específicos, se estandarizó la metodología y se determinaron los genotipos para la evaluación de las frecuencias genotípicas y alélicas. El diseño de cebadores fue realizado en base a lo reportado por Ruiz-Sanz et al. (2007), dado que únicamente se conservaron los cebadores alelo específicos (también conocidos como *inner*) para la identificación del polimorfismo rs4680. Mediante el programa en línea Primer 3 Plus, se diseñaron cebadores alelo no específicos (también conocidos como *outer*) para la obtención de amplicones con que abarquen toda la secuencia de interés. Se esperó reducir el tamaño del amplicón alelo no específico para mejorar la eficiencia de la reacción. Los cebadores completos diseñados por Ruiz-Sanz et al. (2007) generaban un amplicón de 626 pb como máximo, dado que fueron propuestos para una genotipificación por PCR convencional; sin embargo, para la optimización de nuestra metodología

basada en PCR en tiempo real Tetra – Plex, se buscó optimizar el diseño de cebadores para generar un amplicón 200 pb en promedio, dado que brinda mayor estabilidad y menor tasa de error para la PCR en tiempo real (Holm et al., 2021).

Para una adecuada discriminación de los genotipos del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, se buscó una diferencia mayor de 1 °C entre las temperaturas de los amplicones alelo específicos y no específicos, para evitar el solapamiento de curvas de *melting*. Se utilizó el programa en línea *uMelt* (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>) para determinar de una forma más precisa las diferencias entre los amplicones, dado que realiza una PCR en tiempo real *in silico*. De esta forma, se observó un solapamiento de los amplicones generados por los grupos 02 y 03; mientras que en los grupos 01 y 04 tuvieron un menor efecto de solapamiento (Anexo E). Asimismo, se consideró un valor mínimo para la formación de estructuras secundarias evaluando el valor ΔG .

Inicialmente se eligieron los grupos 01 y 04 para la estandarización de la metodología; no obstante, las reacciones con los cebadores del grupo 01 mostraron una alta amplificación inespecífica que presentaba una curva de *melting* de 84 °C, lo cual solapaba la amplificación correcta de metionina y perjudicaba su discriminación. Por lo tanto, solamente se emplearon los cebadores correspondientes al grupo 04. No obstante, este grupo de cebadores fue el mejor diseñado, dado a su estabilidad, menor tamaño de producto de amplificación (204 pb), menor probabilidad de formación de estructuras secundarias, temperatura de *melting* por debajo de 60°C y una diferencia teórica de más de 1 °C entre amplicones para las curvas de *melting*.

Una de las limitaciones que presentó el estudio fue la falta de controles positivos de cada genotipo (Val/Val, Met/Met y Val/Met). Los controles positivos brindarían información sobre las temperaturas y curvas de *melting* esperadas; no obstante, la información genética de las pacientes

mujeres con cáncer de mama fue analizadas previamente por el Chip Affymetrix PMRA (Precision Medicine Research Array) ~900,000 SNPs y, por lo tanto, se desarrolló un análisis en ciego con 10 muestras (tres ensayos realizados por separado) para validar a pequeña escala la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex y determinar las muestras controles. Los resultados fueron corroborados con lo analizado previamente por el Chip Affymetrix PMRA, mostrando una tasa de coincidencia del 100% y un valor *Kappa* de 1.

La estandarización de la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex consistió en la evaluación de la temperatura de *melting*, concentración de cebadores y concentración óptima de ADN (límite de detección). En relación al primer punto, se estandarizó a temperatura de 64 °C por presentar una mejor eficiencia de amplificación y visualización de las curvas de *melting* (Anexo F). Cuando se realizó la PCR en tiempo real Tetra – Plex con una concentración de 3 μ M de cebadores, la curva del alelo no específico sobrelapaba al alelo Val. El inconveniente presentado se corroboró en un estudio *in silico* por el programa en línea *uMelt*. Asimismo, Baris et al. (2013) reportaron el mismo efecto en una PCR en tiempo real Tetra – Plex.

Siguiendo indicaciones de Baris et al. (2013), se propuso disminuir la concentración de cebadores alelo no específicos (*forward* 1 y *reverse* 2), hasta alcanzar la concentración correcta que lograra permitir una discriminación de los genotipos. Se obtuvo que, reduciendo la concentración 10.5 veces para el cebador *forward* 1 (0.0281 μ M) y 15 veces para el cebador *reverse* 2 (0.2 μ M), pero manteniendo la concentración de los cebadores alelo específicos *forward* 2 y *reverse* 1 (3 μ M), se reduce la amplificación del alelo no específico, obteniendo una única curva de *melting* para el genotipo Val/Val, dos para el alelo Met/Met y 03 para el alelo Val/Met (Fig. 10).

La estandarización de la cantidad de ADN por reacción se realizó con diferentes valores de 4 diluciones seriadas: 50, 25, 12.5 y 6.25 ng. La discriminación fue correcta hasta 12.5 ng por reacción; no obstante, con el objeto de evitar una discriminación dificultosa de los genotipos, se decidió elegir 50 ng como parámetro de concentración de ADN por reacción, dado que las curvas eran más definidas y la amplificación era mayor.

El ensayo en ciego de la genotipificación de 20 muestras de ADN de pacientes con cáncer de mama mostró una robustez intra e inter ensayo y se correspondió con una tasa de coincidencia del 100%. Asimismo, este análisis fue parte de un ensayo de validación a pequeña escala (Tabla 12).

Para evaluar la concordancia de la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex, se realizó la comparación entre la genotipificación por PCR en tiempo real Tetra – Plex y la información genética analizada por el Chip Affymetrix PMRA, de 97 muestras de ADN provenientes de pacientes mujeres con cáncer de mama (se incluyeron 20 muestras del ensayo de robustez y se excluyeron 4 muestras debido a la falta de información genética). El resultado demostró una tasa de coincidencia del 100% y un valor *Kappa* de 1 para las muestras analizadas (Tabla 11), validando exitosamente la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex para la genotipificación del polimorfismo rs4680. Cabe resaltar que el un valor *Kappa* de 1 indica una coincidencia del 100%, mientras que, si disminuye el valor *Kappa*, también se reduce la coincidencia de los resultados (Iseki, 2020).

Las frecuencias genotípicas fueron estimadas en 0.5 para el genotipo Val/Val, 0.39 para el genotipo Val/Met y 0.11 para el genotipo Met/Met, cumpliendo con el equilibrio de HW ($X^2 = 0.670$; $p > 0.05$). Las frecuencias alélicas reportadas en este estudio fueron de 0.691 y 0.309 para

el alelo valina y metionina, respectivamente. Los valores obtenidos son similares a los reportados anteriormente en una población mixta peruana y en pacientes con esquizofrenia en el Perú (Acosta, 2015; Huerta et al., 2007); sin embargo, en este estudio se determinó una mayor, pero no significativa ($p > 0.07$) frecuencia del genotipo Val/Val. La hipótesis planteada en este estudio consideraba una mayor frecuencia del genotipo Val/Met, seguida del genotipo Val/Val y Met/Met. No obstante, los resultados mostraron una mayor frecuencia genotípica para Val/Val, seguida de Val/Met y Met/Met.

Actualmente, los estudios de genotipificación del polimorfismo rs4680 son desarrollados empleando metodologías como PCR – RFLP, análisis de todo el genoma, secuenciación por Sanger, espectrometría de masas y PCR en tiempo real con sondas Taqman (Bhattacharjee et al., 2024; Chi et al., 2023; Dean et al., 2020; Sagud et al., 2023). No obstante, estas metodologías pueden considerarse costosas y laboriosas.

La genotipificación mediante la técnica de PCR en tiempo real Tetra-Plex se presenta como una herramienta altamente eficaz y eficiente, proporcionando resultados precisos en un tiempo reducido (3 horas) y a un costo aproximado de US 7.5 dólares por muestra. La versatilidad de esta metodología no se limita exclusivamente al análisis de un polimorfismo específico, sino que puede extrapolarse hacia la evaluación de otros polimorfismos de relevancia médica. La capacidad de realizar una única corrida de PCR en tiempo real con diferentes cebadores específicos para cada polimorfismo facilita la obtención de un perfil polimórfico integral de una persona en una sola ejecución, destacando así la conveniencia y versatilidad de esta técnica en la caracterización genotípica con un enfoque rentable.

VI. CONCLUSIONES

- Las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en este estudio para una población de 97 mujeres con diagnóstico clínico cáncer de mama fueron 0.5, 0.39 y 0.11 (Val/Val, Val/Met y Met/Met); y 0.691 (Val) y 0.309 (Met) ($X^2 = 0.670$; $p > 0.05$), respectivamente.
- Se optimizó eficientemente la metodología de PCR en tiempo real Tetra – Plex para la genotipificación del polimorfismo rs4680 del gen *COMT*, empleando 04 cebadores: dos alelo específicos y dos alelo no específicos.
- La metodología desarrollada demostró una tasa de coincidencia del 100% y un valor *Kappa* de 1, cuando se comparó con una técnica *Gold Standard* como el Chip Affymetrix, validando la precisión del ensayo.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar futuros estudios con una muestra más grande para confirmar los hallazgos actuales y aumentar la validez estadística, especialmente en la identificación de asociaciones entre polimorfismos genéticos y la respuesta cognitiva a tratamientos para el cáncer de mama.
- Evaluar la variabilidad genética en distintas poblaciones peruanas. Esto ayudaría a identificar si existen diferencias significativas en la distribución del polimorfismo rs4680 del gen COMT, especialmente en contextos de salud pública y tratamientos oncológicos personalizados.

VIII. REFERENCIAS

- Acosta, O. (2015). *Polimorfismo en el gen de la catecol o-metil transferasa (comt) y su asociacion con la esquizofrenia en una muestra peruana*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional UNMSM. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4470>
- Axelrod, J. y Tomchick, R. (1958). Enzymatic O-methylation of Epinephrine and others catechols. *Journal of Biological Chemistry*, 203(3), 702–705.
- Baris, I., Etlik, O., Koksal, V., Ocak, Z. y Baris, S. (2013). SYBR green dye-based probe-free SNP genotyping: Introduction of T-Plex real-time PCR assay. *Analytical Biochemistry*, 441(2), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.007>
- Bhattacharjee, D., Guðjónsdóttir, A., Chova, P., Middelburg, E., Jäckels, J., de Groot, N., Wallner, B., Massen, J. y Pflüger, L. S. (2024). Behavioral, physiological, and genetic drivers of coping in a non-human primate. *IScience*, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108890>
- Bonilla, J., Rodríguez, R., Trujillo, P. A., González, A. del P. y Gonzalez, A. (2016). Cognitive development in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, 15(4), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.07.004>
- Bowden, C., Cheetham, S., Lowther, S., Katona, C., Crompton, M. y Horton, R. (1997). Reduced dopamine turnover in the basal ganglia of depressed suicides. *Brain Research*, 769(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00692-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00692-6)

- Buskbjerg, C., Amidi, A., Demontis, D., Nissen, E. y Zachariae, R. (2019). Genetic risk factors for cancer-related cognitive impairment: a systematic review. *Acta Oncologica*, 58(5), 537–547. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2019.1578410>
- Cao, H. y Shockey, J. (2012). Comparison of TaqMan and SYBR green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12296–12303. <https://doi.org/10.1021/jf304690e>
- Casavilca-Zambrano, S., Custodio, N., Cancino-Maldonado, K., Liendo-Picoaga, R. y Vidaurre-Rojas, T. (2017). Deterioro cognitivo por quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama. Una problemática por definir en el Perú. *Revista de Neuro-Psiquiatria*, 80(4), 239. <https://doi.org/10.20453/rnp.v80i4.3238>
- Chi, J., Ma, Y., Shi, M., Lu, C., Jiang, Q., Li, Y., Zhang, X., Shi, X., Li, S. y Wang, L. (2023). Associations between Catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms and cognitive impairments, psychiatric symptoms and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Brain Research*, 1826, 148740. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148740>
- Dean, B. y Scarr, E. (2016). COMT genotype is associated with differential expression of muscarinic M1 receptors in human cortex. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 171(6), 784–789. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32440>
- Dean, B., Parkin, G. y Gibbons, A. (2020). Associations between catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes at rs4818 and rs4680 and gene expression in human dorsolateral prefrontal cortex. *Experimental Brain Research*, 238(2), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05730-0>

- Dempster, E., Mill, J., Craig, I. y Collier, D. (2006). The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: Diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Medical Genetics*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-10>
- Dunlop, B., y Nemeroff, C. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*, 64(3), 327–337. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327>
- Egan, M., Goldberg, T., Kolachana, B., Callicott, J., Mazzanti, C., Straub, R., Goldman, D. y Weinberger, D. (2001). Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6917–6922. <https://doi.org/10.1073/pnas.111134598>
- El-Agamy, S., Abdel-Aziz, A., Esmat, A. y Azab, S. (2019). Chemotherapy and cognition: comprehensive review on doxorubicin-induced chemobrain. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 84(1). <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03827-0>
- Esmail, N., Ashaat, E., Mosaad, R., Fayez, A., Ibrahim, M., Abdallah, Z., Issa, M., Salem, S., Ramadan, A., El Wakeel, M., Ashaat, N., Zaki, M. y Ismail, S. (2020). The potential impact of COMT gene variants on dopamine regulation and phenotypic traits of ASD patients. *Behavioural Brain Research*, 378, 112272. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112272>
- Grossman, M., Emanuel, B. y Budarf, M. (1992). Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1→q11.2. *Genomics*, 12(4), 822–825. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90316-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90316-K)

- Guevara Casallas, L., Holguín Rojas, J., y Ortega, R. (2013). Tratamiento oncológico. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 28(SUPPL. 1), 41–44.
- Harukazu Iseki. (2020). Cohen's kappa statistics as a convenient means to identify accurate SARSCoV-2 rapid antibody tests. *MedRxiv*.
- Holm, W., Ghesquière, J., Boon, N., Verspecht, T., Bernaerts, K., Zayed, N., Chatzigiannidou, I., y Teughels, W. (2021). A Viability Quantitative PCR Dilemma: Are Longer Amplicons Better? *Applied and environmental microbiology*, 87(5), e02653-20 <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Hong, J., Shu-Leong, H., Tao, X., y Lap-Ping, Y. (1998). Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *NeuroReport*, 9(12), 2861–2864. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808240-00033>
- Huang, C., Chern, H., Chang, K., Cheng, C., Hsu, S., y Shen, C. (1999). Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitotic checkpoint genes: A multigenic study on cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 28(5), 1079–1086. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl256>
- Huerta, D., Acosta, O., Polo, S., Martinez, R., Oré, R., y Miranda, C. (2007). Polimorfismo Val108/158Met en el gen dopaminérgico catecolo- metil transferasa (COMT) en una población mixta peruana y su importancia para los estudios neuropsiquiátricos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 68(4), 321. <https://doi.org/10.15381/anales.v68i4.1196>
- Käenmäki, M., Tammimäki, A., Myöhänen, T., Pakarinen, K., Amberg, C., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., y Männistö, P. T. (2010). Quantitative role of COMT in dopamine clearance

- in the prefrontal cortex of freely moving mice. *Journal of Neurochemistry*, 114(6), 1745–1755. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06889.x>
- Khanthiyong, B., Thanoi, S., Reynolds, G., y Nudmamud-Thanoi, S. (2019). Association study of the functional Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met polymorphism on executive cognitive function in a Thai sample. *International Journal of Medical Sciences*, 16(11), 1461–1465. <https://doi.org/10.7150/ijms.35789>
- Lachman, H., Papolos, D., Saito, T., Yu, Y., Szumlanski, C., y Weinshilboum, R. (1996). Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *In Pharmacogenetics (Vol. 6, Issue 3, pp. 243–250)*. <https://doi.org/10.1097/00008571-199606000-00007>
- Lajin, B., y Alachkar, A. (2011). Detection of catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met Polymorphism by a New Optimized PCR-RFLP Method. *American Journal of Biomedical Sciences*, 3, 170-175. <https://doi.org/10.5099/aj110300170>
- Lavigne, J., Helzlsouer, K., Huang, H., Strickland, P., Bell, D., Selmin, O., Watson, M., Hoffman, S., Comstock, G., y Yager, J. (1997). An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Research*, 57(24), 5493–5497.
- Little, S. (1995). Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations . *Current Protocols in Human Genetics*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0908s07>

- López S., Jaime S. y Jaime F. (2011). CHEMOBRAIN: Revisión de estudios que evalúan el deterioro cognitivo de supervivientes de cáncer tratados con quimioterapia. *PSICOONCOLOGÍA*, Vol. 8, Núm. 2-3. https://doi.org/10.5209/rev_PSIC.2011.v8.n2-3.37881
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melén, K., Julkunen, I., y Taskinen, J. (1995). Kinetics of Human Soluble and Membrane-Bound Catechol O-Methyltransferase: A Revised Mechanism and Description of the Thermolabile Variant of the Enzyme. *Biochemistry*, 34(13), 4202–4210. <https://doi.org/10.1021/bi00013a008>
- Männistö, P. y Kaakkola, S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 51(4), 593–628.
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P. y Osta, R. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC. Revista Científica Internacional de Acuicultura En Español*, 0(15).
- Massat, I., Souery, D., Del-Favero, J., Nothen, M., Blackwood, D., Muir, W., Kaneva, R., Serretti, A., Lorenzi, C., Rietschel, M., Milanova, V., Papadimitriou, G., Dikeos, D., Van Broekhoven, C. y Mendlewicz, J. (2005). Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Molecular Psychiatry*, 10(6), 598–605. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001615>
- Mizuno, Y., Jung, M., Fujisawa, T., Takiguchi, S., Shimada, K., Saito, D., Kosaka, H. y Tomoda, A. (2017). Catechol-O-methyltransferase polymorphism is associated with the cortico-

- cerebellar functional connectivity of executive function in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04579-8>
- Mohd, H., Al-Tawfiq, J. y Memish, Z. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir Susanna Lau. *Virology Journal*, 13(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>
- Mullis, K. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.
- Muniyandi, D., Ganesan, R., Meenakshisundaram, M., y Palanichamy, S. (2018). Effect of cancer chemotherapy on cognitive function. *International Journal of Cancer Research*, 14(2), 52–57. <https://doi.org/10.3923/ijcr.2018.52.57>
- Najmabadi, H. y Teimourian, M. (2001). Amplification refractory mutation system (ARMS) and reverse hybridization in the detection of β -thalassemia mutations. 4(4), 165–170.
- Ojeda, D., Lopez, S., Novartis, L., Forero, D., Ojeda, D., López-León, S., y Forero, D. (2014). A novel cost-effective assay based on real-time PCR for COMT Val158Met genotyping Characteristics of young adults with binge drinking View project Addiction and dual diagnosis View project A novel cost-effective assay based on real-time PCR for COMT Val158Met genotyping. *Taylor y Francis*, 19(7), 567–570.
<https://doi.org/10.3109/1354750X.2014.948069>
- Parkin, G., Udawela, M., Gibbons, A., Scarr, E. y Dean, B. (2018). Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes are associated with varying soluble, but not membrane-bound COMT

- protein in the human prefrontal cortex. *Journal of Human Genetics, Journal of human genetics*, 63(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0511-2>
- Pinilla, G., Cubillos, K., y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista NOVA*, 6(9). In revistas.unicolmayor.edu.co.
- Ren, X., Boriero, D., Chaiswing, L., Bondada, S., St. Clair, D. y Butterfield, D. (2019). Plausible biochemical mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment (“chemobrain”), a condition that significantly impairs the quality of life of many cancer survivors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(6), 1088–1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.007>
- Ricardo, B., Trujillo, G. y Arias-Montaño, J. (1999). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39–60. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i1.218>
- Riccardi, L., Lanzellotto, R., Falconi, M., Ceccardi, S., Bini, C. y Pelotti, S. (2014). Development of a tetraplex PCR assay for CYP2D6 genotyping in degraded DNA samples. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 690–695. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12358>
- Rubio, B., Sirgo, A., Forcadell, E. y Mele, M. (2009). Oncológicos Sistémicos En El Cáncer De Mama No Metastático : Revisión De Estudios. *Psicooncología*, 6(1), 83.
- Ruiz-Sanz, J., Aurrekoetxea, I., del Agua, A. y Ruiz-Larrea, M. (2007). Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 21(3), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.12.001>.

- Sagud, M., Tudor, L., Nedic, G., Perkovic, M., Uzun, S., Mimica, N., Madzarac, Z., Zivkovic, M., Kozumplik, O., Konjevod, M., Svob, D. y Pivac, N. (2023). Genotypic and Haplotypic Association of Catechol-O-Methyltransferase rs4680 and rs4818 Gene Polymorphisms with Particular Clinical Symptoms in Schizophrenia. *Genes*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/genes14071358>
- Sandoval, C. y Ostrosky, F. (2012). Efectos del polimorfismo Val108/158Met del gen dopaminérgico Catecol-O-metil transferasa COMT en las funciones ejecutivas de preescolares. *Revista Chilena de Neuropsicología*, 7(3), 115–121. <https://doi.org/10.5839/rcnp.2012.0703.04>
- Small, B., Rawson, K., Walsh, E., Jim, H. y Hughes, T. (2011). Catechol-O-Methyltransferase Genotype Modulates Cancer Treatment-Related Cognitive Deficits in Breast Cancer Survivors. *Cancer*, 117(7), 1369–1376. <https://doi.org/10.1002/cncr.25685>.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. y Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
- Wakiuchi, J., Marcon, S., Oliveira, D. y Sales, C. (2019). Chemotherapy under the perspective of the person with cancer: A structural analysis. *Texto e Contexto Enfermagem*, 28, 1–13. <https://doi.org/10.1590/1980-265x-tce-2018-0025>.
- Yang, G., Kumar, S., Dorsey, S., Starkweather, A., Kelly, D. y Lyon, D. (2019). Systematic review of genetic polymorphisms associated with psychoneurological symptoms in breast cancer survivors. *Supportive Care in Cancer*, 27(2), 351–371. <https://doi.org/10.1007/s00520-018-4508-3>.

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A., y Day, I. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 29(17), 88–88.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>

Zhu, G., Lipsky, R., Xu, K., Ali, S., Hyde, T., Kleinman, J., Akhtar, L., Mash, D., y Goldman, D. (2004). Differential expression of human COMT alleles in brain and lymphoblasts detected by RT-coupled 5' nuclease assay. *In Psychopharmacology*, 177, Issues 1–2, pp. 178–184).
<https://doi.org/10.1007/s00213-004-1938-z>.

IX. ANEXOS

Anexo A

Carta de aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación.



"ARO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

Surquillo, 21 de noviembre del 2017

CARTA N° 420 – 2017 – CIE/INEN

M.C.
SANDRO CASAVILCA ZAMBRANO
 Investigador principal
 Presente.-

REFERENCIA : PROTOCOLO: "RUMBO A LA TERAPIA INDIVIDUALIZADA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA CON RIESGO DE DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A QUIMIOTERAPIA". INEN 17-79.

ASUNTO: REVISION Y APROBACION

Mediante el presente, tengo a bien dirigirme a usted para informarle que los Miembros del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) del INEN, **REVISAN Y APRUEBAN** la siguiente documentación remitida del protocolo en referencia:

- PROTOCOLO DE ESTUDIO CLÍNICO
- CONSENTIMIENTO INFORMADO

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,



DR. KRISTINES JIVIANA SÁNCHEZ LÓPEZ
 Dra. Ginecóloga
 Comité Institucional de Ética en Investigación
 Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

c.c.: Archivo
 L.G.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS
 Av. Angamos Este 2526, Lima - 24 Telf: 201-4500 Fax: 420-4991 Web: www.inen.edu.pe e-mail: post@inera.inen.edu.pe

Anexo B

Aprobación del consentimiento informado del Banco de Tejidos Tumorales.



"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

Surquillo, 18 de Agosto del 2017

CARTA Nº 293 – 2017 –CIE/INEN

M.C
CASAVILCA ZAMBRANO SANDRO,

Investigador Principal

Presente.-

REFERENCIA: CONSENTIMIENTO INFORMADO-BANCO DE TEJIDOS TUMORALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLASICAS

ASUNTO: TOMA DE CONOCIMIENTO – APROBACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Tengo a bien dirigirme a usted para informarle que el Comité Institucional de Ética en Investigación del INEN, **APRUEBA Y da el VºBº** de la siguiente documentación remitida del protocolo en referencia:

Aientamente,

c.c.: Archivo
D. G.

Anexo C

Consentimiento Informado del Banco de Tejidos Tumorales.

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Banco de Tejidos tumorales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas "Dr. Eduardo Cáceres Graziani"

El Banco de Tejidos Tumorales (BTT) tiene la finalidad de recoger y conservar muestras biológicas humanas en condiciones adecuadas de seguridad y trazabilidad, que serán utilizadas para proyectos de investigación que hayan sido aprobados por el Comité Institucional de Ética en Investigación del INEN. Los datos personales serán dissociados de las muestras mediante un sistema de codificación propio, manteniendo la confidencialidad de su identidad. Asimismo, es posible la revocación del consentimiento, para ello deberá ponerse en contacto con el personal responsable de la Base de Datos del BTT. La decisión de permitir utilizar las muestras para fines de investigación es totalmente voluntaria por su parte. Su decisión, sea cual fuere, no conllevará penalización alguna, ni afectará en ningún modo a las cuidados médicos, tratamiento o la asistencia que pueda necesitar en un futuro. No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Las muestras no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

Declaración del donante:
 Declaro que he sido informado sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento, el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras, que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores. Además, declaro que en cualquier momento puedo revocar el consentimiento y solicitar la eliminación de todos mis datos personales y las muestras que permanezcan almacenadas en el Biobanco. Esta eliminación no se extenderá a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo. Finalmente, declaro que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Consiento en donar voluntariamente y que el BTT u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos, las muestras y los resultados de las mismas frente a diversas metodologías científicas como: el análisis de expresión de genes, detección de mutaciones, secuenciamiento parcial o total del genoma, análisis de proteínas, entre otros procesos empleados en la investigación, para realizar publicaciones científicas; manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.

Yo, mi Representante Legal o Tutor, accedo (marcar Sí o No) a que el personal del BTT contacte en el futuro con los familiares del donante, en caso de que se considere oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
 Sí
 No

Yo, mi representante Legal o Tutor, deseo (marcar Sí o No) que los familiares del donante sean informados de los posibles hallazgos genéticos de relevancia clínica para ellos.
 Sí
 No

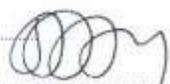
D./Dña.....
 Edad.....DNI.....
 Domicilio.....
 Distrito.....
 HC.....

Firma

IDENTIFICACIÓN DEL REPRESENTANTE (en caso de minoría legal o discapacidad)
 D./Dña.....
 Edad.....DNI.....
 Domicilio.....
 Distrito.....
 e-mail.....

Firma

Declaración del profesional de salud:
 He informado debidamente al donante,
 Fdo.: Dr/a..... Colegiado/a nº..... Fecha:.....


 INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS
 BANCO DE TEJIDOS TUMORALES
 Comité Institucional de Ética en Investigación

Anexo D

Concentración y ratios de pureza de ADN extraído proveniente de pacientes mujeres con cáncer de mama.

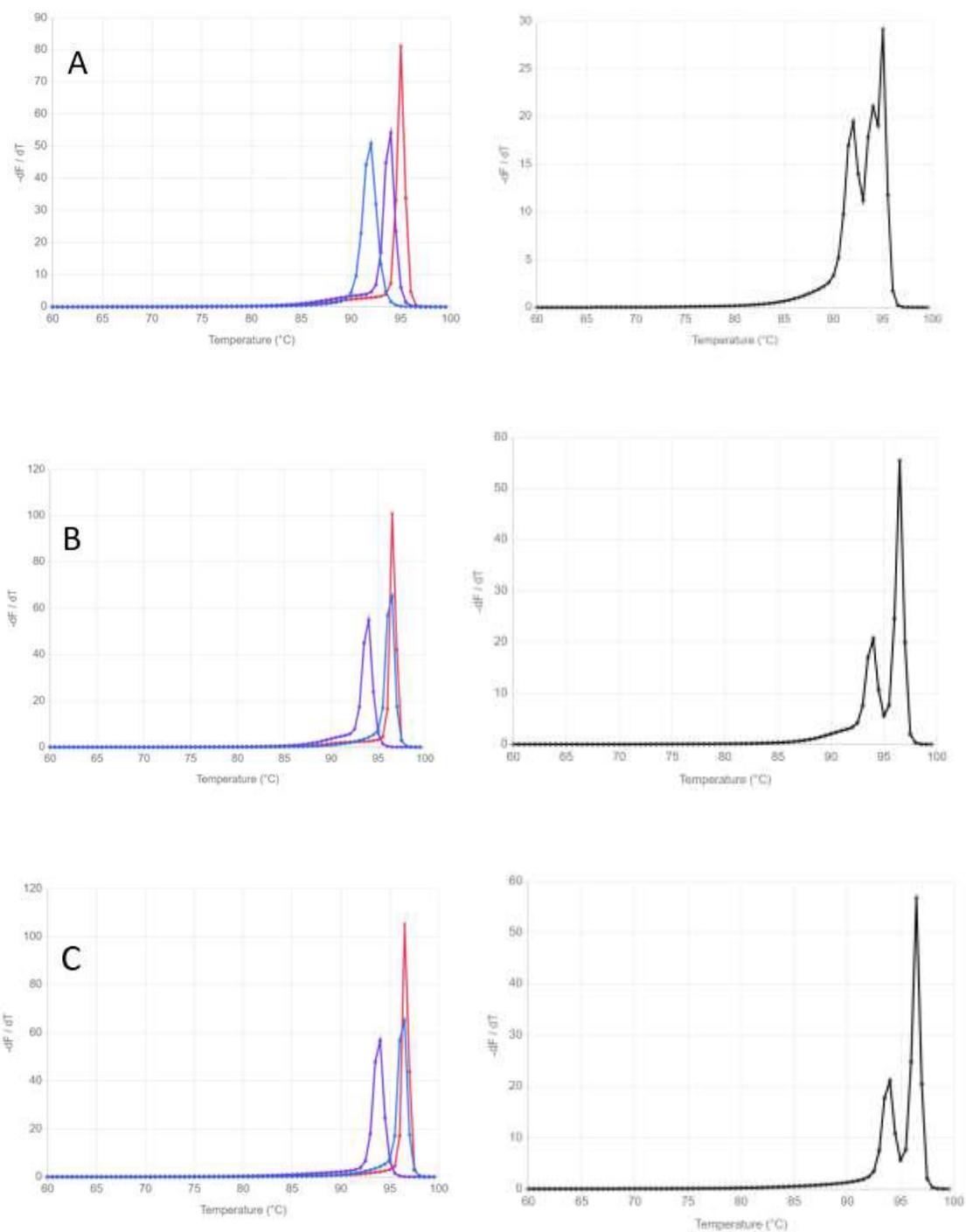
Nº	[DNA] ng/μL	260/280	260/230
1	101	1.94	1.80
2	60.3	1.95	1.77
3	57.7	1.93	1.90
4	60	1.97	1.95
5	103	1.96	2.19
6	70	1.97	2.14
7	69.3	1.92	1.73
8	112	1.89	1.70
9	46.4	1.95	2.16
10	15	2.33	0.66
11	55.5	1.95	2.07
12	107	1.94	2.00
13	111.6	1.88	1.95
14	37	2.01	2.20
15	53.6	1.97	2.03
16	89	1.86	1.95
17	99	1.84	1.86
18	121	1.87	1.86
19	130.7	1.88	1.94
20	51.4	1.88	1.70
21	53	1.89	1.63
22	51.6	1.89	1.72
23	127.7	1.90	2.03
24	120.4	1.88	1.89
25	75.2	1.89	1.94
26	48.3	1.93	2.16
27	58.7	1.92	2.05
28	72	1.87	1.81
29	121.4	121.40	1.92
30	83.6	83.60	1.57
31	65.1	1.89	2.00
32	81	1.79	1.60
33	75.7	1.87	2.16

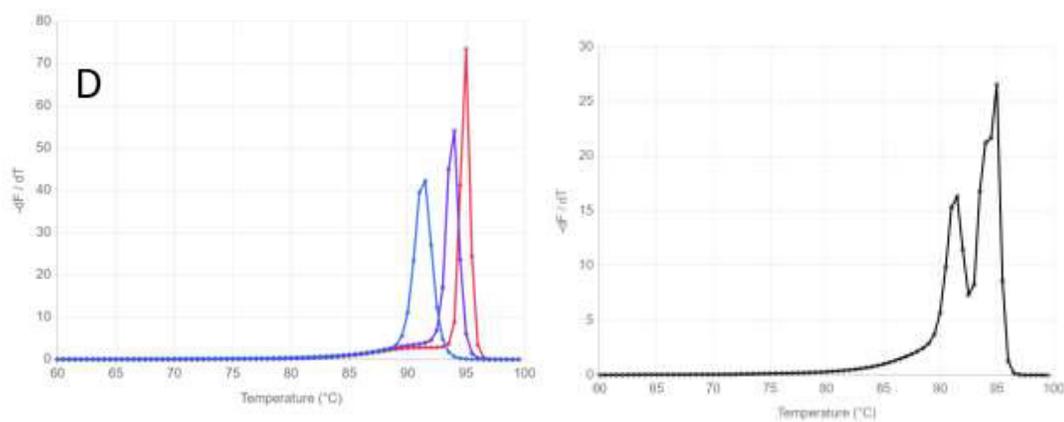
34	72.6	1.85	1.70
35	63.4	1.94	2.24
36	40.1	1.60	0.60
37	65.2	1.86	1.40
38	13.3	2.04	1.44
39	58.3	1.89	1.55
40	97.2	1.85	1.87
41	123.8	1.86	1.97
42	97	1.88	1.96
43	56.9	1.94	2.65
44	66.6	1.91	2.06
45	57.6	1.80	1.60
46	70.8	1.84	1.72
47	59.6	1.87	2.16
48	57.3	1.88	1.92
49	88.9	1.90	2.18
50	63.2	1.92	2.20
51	58.3	1.85	1.59
52	51.8	1.84	1.84
53	64.7	1.86	1.54
54	61.9	1.84	1.62
55	70.4	1.84	1.54
56	73.6	1.84	1.63
57	78.9	1.85	1.84
58	64.2	1.87	1.33
59	88.8	1.82	1.50
60	66.3	1.87	1.57
61	84.6	1.91	2.08
62	46.3	1.91	2.28
63	35.9	1.95	2.09
64	77	1.91	2.06
65	62.6	1.87	1.87
66	97.9	1.80	1.52
67	49.4	1.89	1.88
68	79.8	1.91	2.31
69	140.3	1.90	2.41
70	31.7	1.92	2.40
71	32	1.95	2.24
72	36.7	1.98	1.97
73	36.4	2.02	2.13
74	67.2	1.93	2.36
75	16.1	1.97	1.96

76	13.9	1.88	1.93
77	8.7	2.03	1.74
78	33.2	1.94	1.72
79	30.5	2.01	2.01
80	23.4	2.12	2.57
81	35.8	1.98	2.21
82	32.3	1.95	2.16
83	22.4	2.00	1.30
84	19.6	2.07	1.96
85	9.4	1.99	2.10
86	20.5	2.17	2.10
87	14.7	1.94	2.14
88	21.4	1.91	2.21
89	21.4	2.05	1.87
90	57.3	1.93	1.87
91	90.1	1.92	1.97
92	13	1.86	1.89
93	91.5	1.89	1.80
94	13.2	2.08	2.59
95	68	1.96	2.40
96	62	1.90	1.72
97	49.2	1.89	1.63
98	59.2	1.94	2.42
99	26	1.93	2.41
100	77.8	1.81	1.43
101	62.8	1.87	1.50

Anexo E

Resultados de uMelt.

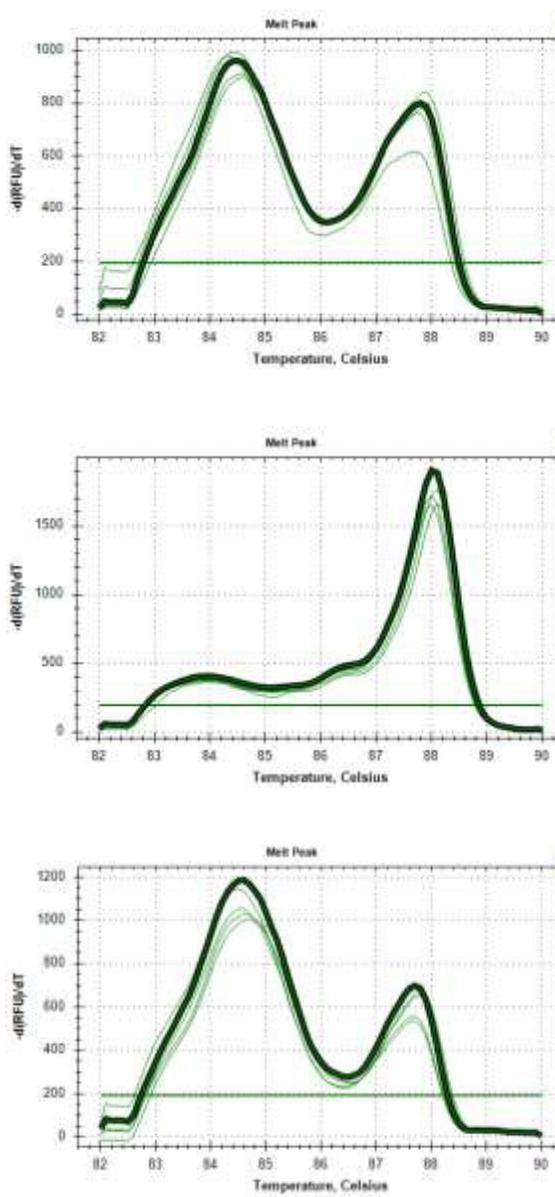




Nota. Análisis realizado con una herramienta in silico uMelt (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>). A, grupo de cebadores 01; B, grupo 02; C, grupo 03 y D, grupo 04.

Anexo F

Gradiente de temperatura de *melting*.



Nota. Se muestra resaltado la temperatura óptima que se eligió (64 °C).