

DESARROLLO METODOLÓGICO PARA UN ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *HCN4* Y *CYP3A4* Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA A LA IVABRADINA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA.

*METHODOLOGICAL DEVELOPMENT A PHARMACOGENETIC STUDY OF THE PRESENCE OF POLYMORPHISMS IN THE *HCN4* AND *CYP3A4* GENES AND ITS ROLE ON THE RESPONSE TO THE TREATMENT WITH IVABRADINE IN PATIENTS WITH HEART FAILURE.*

*DESENVOLVO DA METODOLOGÍA PARA O ESTUDO FARMACOGENÉTICO DOS POLIMORFISMOS DOS XENES *HCN4* E *CYP3A4* E O SEU EFECTO NA RESPOSTA Á IVABRADINA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA.*

Grecia Manuela Marrón Liñares

Tutora: Dra. Lucía Núñez Fernández

INIBIC: Grupo de Cardiología

Máster Biotecnología Avanzada. Curso 2013-2014

INDICE.

	Pág.
1. Resumen	3
2. Introducción	4
2.1. Insuficiencia cardíaca (IC).	4
2.1.1. Tratamientos para la IC.	4
2.2. Farmacogenética.	6
2.2.1. Diferencias estructurales en el canal que genera la corriente I_f que pueden afectar a la conformación del canal	6
2.2.2. Importancia del citocromo P450 isoforma 3A4 en la respuesta a la Ivabradina.	8
3. Objetivos	9
4. Material y métodos	9
4.1. Extracción de ADN genómico.	9
4.2. Optimización de la PCR, diseño de cebadores y amplificación de ADN por PCR convencional.	10
4.3. Separación electroforética de los productos amplificados por PCR y visualización.	15
4.4. Purificación de ADN.	15
4.5. Reacción de secuenciación de ADN.	16
4.6. Purificación de la reacción de secuenciación.	16
4.7. Electroforesis capilar.	17
4.8. Análisis de secuencias.	17
5. Resultados	17
5.1. Diseño de cebadores.	17
5.1.1. Diseño de cebadores para el gen <i>HCN4</i> .	17
5.1.2. Diseño de cebadores para el gen <i>CYP3A4</i> .	23
5.2. Optimización de las PCRs.	24
5.2.1. Optimización PCRs gen <i>HCN4</i> .	25
5.2.2. Optimización PCRs gen <i>CYP3A4</i> .	26
5.3. Secuenciación.	28

5.3.1. Resultados obtenidos en el gen <i>HCN4</i> .	28
5.3.2. Resultados obtenidos en el gen <i>CYP3A4</i> .	30
6. Discusión	31
7. Conclusiones	33
8. Referencias Bibliográficas	34

1. RESUMEN.

Introducción: La frecuencia cardíaca (FC) elevada en reposo es un factor de riesgo alto en pacientes con insuficiencia cardíaca y su control es una estrategia terapéutica en estos pacientes, en especial tras los estudios realizados con Ivabradina. La Ivabradina es un fármaco bradicardizante selectivo que inhibe la corriente I_f en el nódulo sinoauricular. Dos proteínas fundamentales en el efecto de la Ivabradina son el canal HCN4, codificado por el gen *HCN4*, por ser su diana farmacológica y el citocromo P450 isoforma 3A4 por ser la principal enzima que la metaboliza. A la vista de lo anterior, planteamos la hipótesis de que pueden existir variantes en las secuencias de estos genes que tengan algún efecto sobre la FC en los pacientes tratados con Ivabradina. Como fase preliminar para el desarrollo de esta hipótesis este estudio se plantea el desarrollo de la metodología que permita identificar variantes genéticas en los genes mencionados.

Objetivos: Desarrollo de metodología para el análisis genético de *HCN4* y de tres SNPs del gen *CYP3A4*.

Métodos: Los métodos empleados incluyeron: diseño de cebadores específicos para los genes *HCN4* y *CYP3A4*, optimización de condiciones de PCRs y de la reacción de secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas. Para los pasos anteriores se han usado muestras de 11 pacientes en tratamiento con Ivabradina.

Resultados: En el análisis de la secuenciación de todos los exones codificantes del gen *HCN4* se han identificado las siguientes variantes sinónimas: L12L g1030C>G (rs201193660), L520L g39660C>T (rs12909882), P852P g45728G>C (rs117819825) y P1200P g46772A>G (rs529004). En relación con los 3 polimorfismos de *CYP3A4* estudiados (*1B, *22 y *1G), se identificaron variaciones genotípicas en *CYP3A4**1G (20% presentan la variante en heterocigosis).

Conclusiones: La metodología desarrollada ha permitido la identificación de polimorfismos en ambos genes.

La metodología desarrollada posibilita el estudio farmacogenético de respuesta a la Ivabradina en nuestro entorno que evalúe la relevancia funcional de estos polimorfismos.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Insuficiencia cardíaca (IC).

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico caracterizado por un complejo conjunto de síntomas y hallazgos físicos causados por la incapacidad del corazón para satisfacer las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo (Dickstein *et al* 2008). Se inicia por alteraciones en el funcionamiento del corazón y en la regulación neurohumoral, y constituye el estadio final de muchas enfermedades que afectan al corazón. En los últimos años, la IC se ha convertido en uno de los problemas más importantes para la salud pública en los países desarrollados, tanto por el incremento progresivo de su incidencia como por las repercusiones de tipo personal, social y económico que supone. Su prevalencia en los países desarrollados se sitúa en torno al 1-2% de la población adulta y aumenta con la edad, estimándose así que un 6-10% de los pacientes mayores de 65 años tiene IC. Además de una elevada morbilidad, la IC tiene un mal pronóstico, con una cifra elevada de fallecimientos, lo cual se correlaciona directamente con el grado de deterioro de la función cardíaca (Crespo Leiro M. *et al* 2004).

2.1.1 Tratamientos para la IC.

El manejo de los pacientes con IC ha de ser individualizado teniendo en cuenta la etiología, severidad, estadio evolutivo, factores desencadenantes o agravantes y a la comorbilidad que pueden presentar los pacientes. Esto hace que el tratamiento de estos pacientes sea complejo. El tratamiento de la IC ha mejorado notablemente en las últimas décadas con el uso de fármacos como los inhibidores de la enzima conversiva de angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de angiotensina 2 (ARA2), betabloqueantes y antagonistas de la aldosterona. Sin embargo es un campo en constante evolución (Tamargo *et al* 2011).

Diversos hallazgos han demostrado que el control de la frecuencia cardíaca (FC) tiene un papel esencial en la IC crónica, de hecho, el riesgo aumenta directamente con el aumento de la FC por encima de 60 latidos por minuto (lpm) (Fox *et al* 2007). Debemos recordar que la FC es el principal determinante de las demandas miocárdicas de O₂ y del flujo sanguíneo coronario. La FC depende de la actividad eléctrica espontánea de las células marcapasos del nódulo sinoauricular (SA). Estas células presentan una fase de despolarización diastólica que desplaza el potencial de membrana hacia su valor umbral y se inicia un nuevo potencial de acción que se propaga a través del miocardio y produce una respuesta contráctil. La corriente hiperpolarizante marcapasos o *funny current* (I_f) de entrada de iones Na⁺ y K⁺ a través de canales activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN o

hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) es la principal determinante de la inclinación de la fase de lenta despolarización diastólica que en definitiva es la que controla el intervalo entre dos potenciales de acción consecutivos y, por tanto, la frecuencia cardiaca. La corriente I_f se activa lentamente entre -45 y -65 mV, alcanza su amplitud máxima en torno a -100 mV y su potencial de inversión está comprendido entre -10 y -20 mV, lo que se explica por la conductancia mixta de Na^+ y K^+ del canal (Vaquero *et al* 2007) (Figura 1).

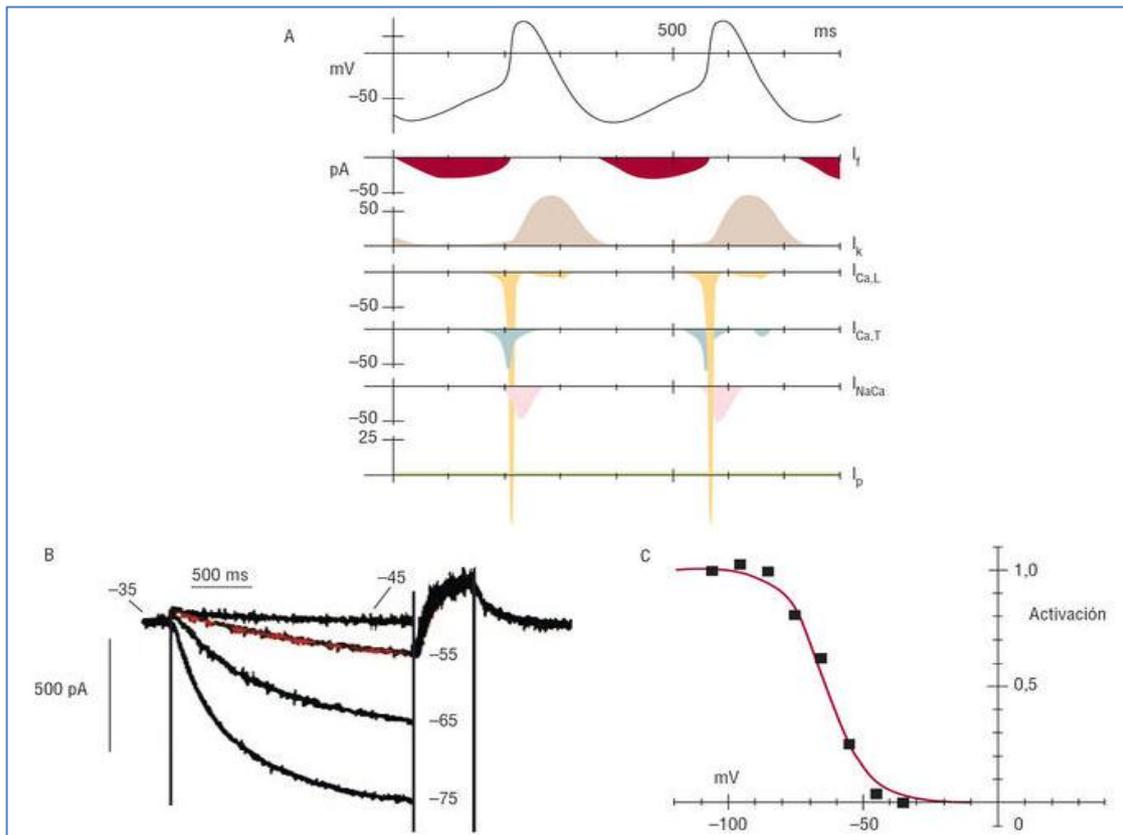


Figura 1.A: simulación por ordenador de las corrientes iónicas implicadas en la generación de un potencial de acción del nodo del seno. La corriente I_f constituye la mayor contribución al proceso de despolarización diastólica excepto en la parte más tardía. **B:** trazos de corriente I_f obtenidos al aplicar pulsos de 2 s de duración entre -75 mV y -45 mV, en escalones de 10 mV, seguidos de un pulso de 500 ms a +5 mV. **C:** curva de activación de la corriente I_f . $I_{Ca,L}$: corriente de calcio tipo L; $I_{Ca,T}$: corriente de calcio tipo T; I_K : corriente de potasio; I_{NaCa} : corriente del intercambiador de sodio-calcio; I_p : corriente de la bomba de sodio-potasio (Baruscotti *et al* y DiFrancesco y Camm). Tomada de (Vaquero *et al* 2007).

Por ello, una buena alternativa para el tratamiento de la IC son los fármacos denominados bradicardizantes selectivos, que son un grupo de fármacos que bloquean la corriente marcapasos hiperpolarizante de las células del nodo SA. Este bloqueo prolonga el intervalo entre dos potenciales de acción consecutivos, reduciendo así la FC (Heusch *et al* 2008).

Dentro de los fármacos bradicardizantes selectivos cabe destacar la Ivabradina que, recientemente, la Agencia Europea para la Evaluación del Medicamento (EMA) aprobó su uso para el tratamiento de IC gracias a los resultados obtenidos con el estudio SHIFT (Swedberg *et al* 2010, Böhm *et al* 2010). En el estudio SHIFT se demostró que los pacientes tratados con Ivabradina tenían un riesgo relativo 18% menor de sufrir muerte cardiovascular

o ingresos en el hospital debido a un empeoramiento de la IC que los pacientes tratados con placebo. Este ensayo clínico demostró que la FC alta es un factor de riesgo en la IC y que la disminución selectiva de la FC mejora los resultados cardiovasculares de los pacientes. También se demostró que la reducción de la FC estaba directamente relacionada con la FC basal, así, la reducción de la FC fue mayor en los pacientes con FC basal >87 lpm (>87 lpm:-22.5 lpm, $80-<87$ lpm:-16.2 lpm, $75-<80$: -14.2 lpm, $72-<75$:-12.6 lpm, $70-<72$:-11.1 lpm). Este hecho era esperable por el mecanismo de acción de la Ivabradina ya que el fármaco se une al canal HCN4 en su estado abierto y esta conformación es mayoritaria a FC altas.

2.2 Farmacogenética.

La farmacogenética es una disciplina que estudia el efecto de la variabilidad genética de un individuo en su respuesta a los fármacos. Esta disciplina ofrece la oportunidad de, con base al perfil genético del paciente, orientar hacia la terapia farmacológica que puede ser más eficaz y que presente menos efectos adversos. Sin embargo, para que las pruebas farmacogenéticas sean ampliamente utilizadas en la práctica clínica, deben demostrar una validez y utilidad clínica confirmadas por grupos independientes y con tamaños muestrales suficientemente grandes (Daudén Tello E. 2006).

Se considera que el 90% de los factores genéticos responsables de la variabilidad a la respuesta del tratamiento farmacológico son polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP). La identificación de SNP con implicaciones farmacogenéticas sería de gran interés para la optimización de las pautas de tratamiento estudiando aquellos que estén presentes en genes que codifican proteínas que participen en el metabolismo o sean la diana de los fármacos objetos de estudio (Hernández Herrero G. *et al* 2010).

Por ello, en el caso de los pacientes tratados con Ivabradina y con la misma FC basal, sería conveniente estudiar las variantes en el canal a través del cual se genera la corriente I_f y en el principal enzima que participa en su metabolismo. Es por este motivo por lo que a continuación se revisará el papel de estas dos proteínas como posibles dianas para un estudio farmacogenético.

2.2.1 Diferencias estructurales en el canal que genera la corriente I_f que pueden afectar a la conformación del canal:

Como ya se explicó anteriormente, la I_f se genera a través de canales activados por la hiperpolarización que están regulados por nucleótidos cíclicos (HCN) constituidos por 4 subunidades, cada una de las cuales presenta 6 segmentos transmembrana. El extremo C-terminal de cada subunidad contiene un dominio de unión de nucleótidos cíclicos (*cyclic*

nucleotide-binding domain, CNBD). Se han descrito 4 tipos distintos de canales HCN (HCN1-4), de modo que la corriente I_f está compuesta por heterotetrámeros de subunidades HCN. Los canales HCN4 son los que predominan en el nodo SA, y se ha descrito un aumento de su expresión en el corazón de pacientes con IC (Stillitano *et al* 2008). La proteína HCN4 está formada por 1203 aminoácidos y codificada por el gen *HCN4*. Para que la Ivabradina produzca el bloqueo de la I_f debe atravesar la membrana y penetrar en el interior de las células del nodo SA. Una vez en el citoplasma, accede por la boca interna del canal HCN hasta alcanzar su punto de unión en el interior del poro e impide el paso de iones a través de él (Bucchi *et al* 2002). El control de la apertura del canal y la unión de la Ivabradina está controlada por distintos aspectos entre los que cabe destacar la unión de AMPc, que se realiza en los aminoácidos 595-710, y la estructura cuaternaria de los segmentos que forman el poro del canal [segmento S5 (421-441), el lazo de unión S5-S6 (442-517) y el segmento S6 (497-517)] (Figura 2) (DiFrancesco *et al* 2006).

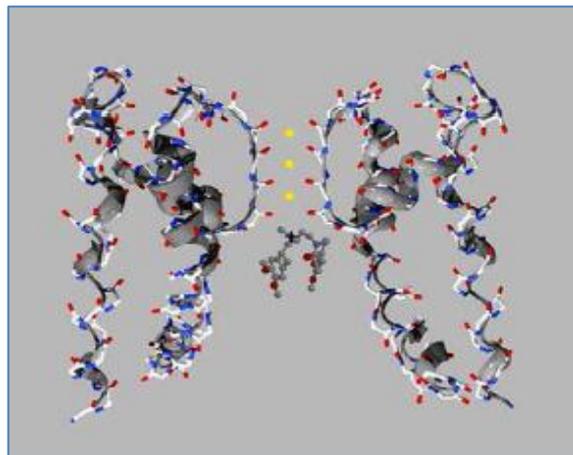


Figura 2. Interacción hipotética de la molécula de Ivabradina con el paso de iones a través de I_f . Alineamiento de HCN4 de humanos con el canal de MthK obtenido por ClustalX y modelado 3D por Deep View-Swiss-Pdb Viewer. Solo se muestran dos de las cuatro subunidades (dominios transmembrana S5-S6) (DiFrancesco *et al* 2006).

Variantes en estas regiones del canal podrían modificar la conformación del mismo impidiendo que la Ivabradina se una de forma efectiva a los aminoácidos Y506 (Tirosina), F509 (Fenilalanina) y I510 (Isoleucina) influyendo por tanto en la respuesta del paciente al tratamiento (Bucchi A *et al* 2013). En la base de datos de SNP de Pubmed se recogen múltiples variantes en la zona de unión de AMPc y mutaciones en la región S5-S6 del canal que se pueden ver en la tabla anexa al final de este estudio. Cabe destacar que por ahora no se ha hecho ningún estudio de la posible implicación de estas variantes en la respuesta a la Ivabradina.

2.2.2 Importancia del citocromo P450 isoforma 3A4 en la respuesta a la Ivabradina:

La Ivabradina se metaboliza principalmente en el hígado a través del citocromo P450 mediante la isoenzima CYP3A4 (Figura 3). En esta isoenzima se han descrito diferentes alelos (tabla anexa al final de este trabajo), cada uno de los cuales está definido por al menos una variante genética (SNP).

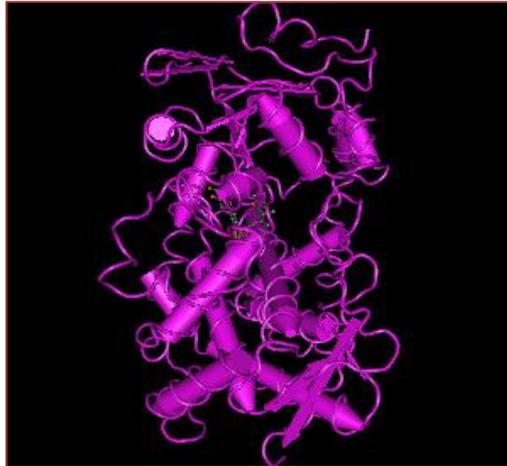


Figura 3. MMDB: Estructura en 3D de la isoenzima CYP3A4 (Madej T. *et al* 2012).

En el caso de *CYP3A4*, el gen está ampliamente estudiado y se han encontrado variantes que pueden modificar la función del mismo. Por lo tanto en este caso resulta más adecuado secuenciar solo los SNPs que definen los alelos más relevantes por afectar a la función de la proteína, y que por tanto podrían influir en el grado de biodisponibilidad de la Ivabradina afectando su eficacia clínica, y que son: *CYP3A4*1B* (rs2740574, Wandel *et al* 2000), *CYP3A4*1G* (rs2242480, He *et al* 2010) y *CYP3A4*22* (rs35599367, Elens *et al* 2011).

A la vista de lo anterior, planteamos la hipótesis de que pueden existir variantes en las secuencias de estos genes que tengan algún efecto sobre la FC en los pacientes tratados con Ivabradina. Como fase preliminar para el testado de dicha hipótesis este estudio se plantea el desarrollo de la metodología que permita identificar variantes genéticas en los genes mencionados.

3. OBJETIVOS.

Desarrollo de metodología para el análisis genético de *HCN4* y de tres SNPs del gen *CYP3A4*.

Este desarrollo es esencial para la realización del estudio posterior en el que se analizará el posible papel de la presencia de polimorfismos en los genes *HCN4* y *CYP3A4* en la reducción de la FC en pacientes con IC en tratamiento con Ivabradina.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Extracción de ADN genómico.

La muestra de la que disponemos para la optimización de las PCRs y secuencias es la misma que se utilizará en el posterior estudio farmacogenético y consiste en sangre anticoagulada con EDTA que se ha obtenido de pacientes con IC en su visita a la consulta de Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco del CHUAC.

A partir de esta muestra realizamos la extracción de ADN genómico empleando para ello el *kitGentra® Puregene®* (Qiagen Hilden-Alemania) que consiste en el tratamiento de los núcleos de los leucocitos con una solución de lisis y una serie de *buffers*, que permiten digerir las proteínas, eliminar el ARN, lavar la muestra y finalmente obtener ADN genómico (Figura 4).

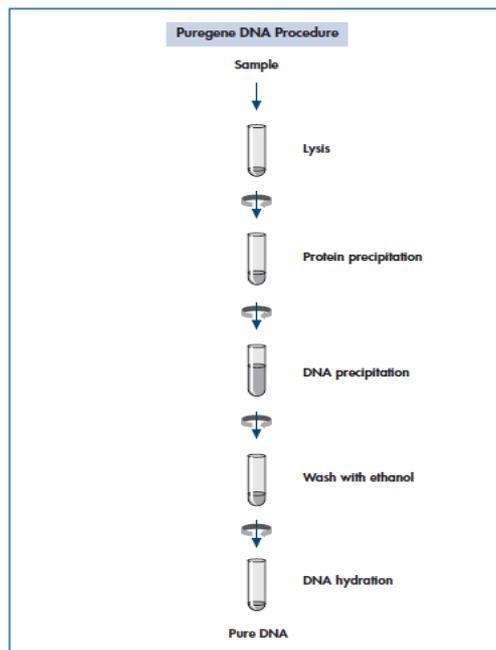


Figura 4. Pasos del protocolo de extracción de ADN genómico empleando el *kitGentra® Puregene®*.

Una vez realizada la extracción de ADN es muy importante comprobar su pureza y su cuantificación. Para comprobar su pureza, se mide espectrofotométricamente la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y a 280 nm (A_{280}), ya que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm; por lo tanto, viendo la relación entre ambas absorbancias ($A_{260/280}$) podremos saber si nuestro ADN genómico extraído está puro o contaminado con restos de proteínas (Figura 5). Para considerar que el ADN genómico de la muestra se ha extraído con la pureza correcta el ratio $A_{260/280}$ debe estar entre 1,8 y 2,0. Esta determinación, al igual que la cuantificación, se llevó a cabo mediante el uso del NanoDrop que es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) (Cultek S.L.U. 2006).

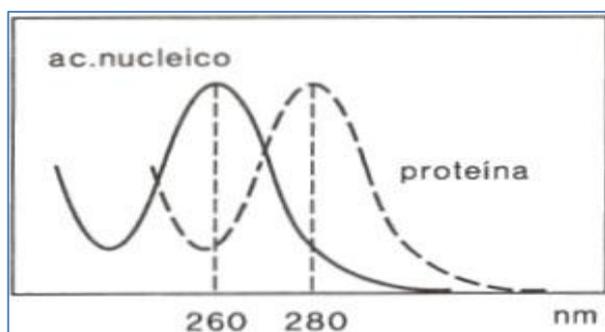


Figura 5. Absorbancia a 260 nm (A_{260}) que es donde los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción y a 280 nm (A_{280}) que es el máximo de absorción de las proteínas. La relación entre ambas nos dará el grado de pureza de nuestro ADN (Cultek S.L.U. 2006).

Una vez cuantificado el ADN genómico, se hicieron diluciones a 20 ng/ μ L para poder normalizar los volúmenes necesarios para llevar a cabo las PCRs.

4.2 Optimización de la PCR, diseño de cebadores y amplificación de ADN por PCR convencional.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la repetición de ciclos de síntesis de ADN dirigida por oligonucleótidos para realizar la replicación *in vitro* de secuencias diana de ácidos nucleicos. Estos oligonucleótidos, cuya secuencia viene determinada por el ácido nucleico diana, se sintetizan para ser complementarios de sus zonas de *annealing* dentro de las hebras de la diana. La distancia entre los cebadores se determina empíricamente y depende de numerosos factores; entre ellos por el tamaño del exón que en nuestro caso varía entre 340 y 1100 pares de bases (pb) (Cultek S.L.U. 2006).

En su forma básica, cada ciclo de PCR consta de (Figura 6):

- Fase de desnaturalización: En ella el ADN diana se incuba a elevada temperatura ($\pm 95^{\circ}\text{C}$) de tal manera que las hebras de ADN se separen quedando accesibles a la hibridación de los cebadores.
- Fase de *annealing*: En ella la mezcla de reacción se enfría ($\pm 57\text{-}62^{\circ}\text{C}$) para permitir la hibridación de los cebadores con la secuencia complementaria.
- Fase de extensión: Se suele realizar a $\pm 72^{\circ}\text{C}$ y en ella los cebadores se extienden mediante una ADN polimerasa, utilizando el ADN diana como molde, y esto se realiza entre 35 y 40 ciclos en cada reacción.

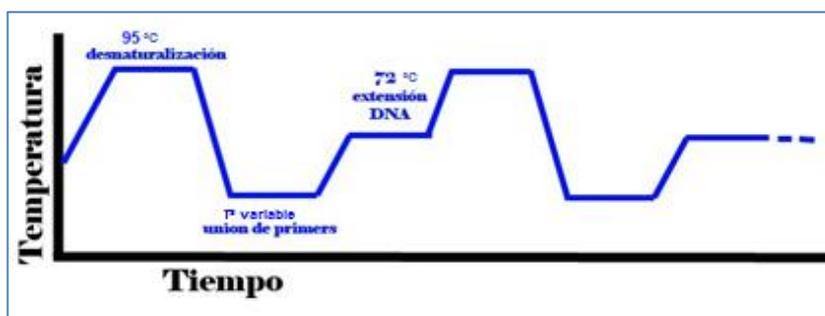


Figura 6. Ciclo amplificación ADN. La temperatura a la cual se unen los cebadores es variable en función de la optimización de las PCRs.

Para la optimización de las reacciones de PCR se han tenido en cuenta numerosos factores, entre los que destacan el diseño de los cebadores y la selección de una temperatura de renaturalización óptima para conseguir una buena especificidad de hibridación de los cebadores con su diana así como la concentración óptima de determinados elementos químicos de la solución, como el cloruro de magnesio (MgCl_2) y el pH adecuado (Prats G. 2006).

La elección de los cebadores es un elemento crítico para el desarrollo de los sistemas de detección basados en la amplificación de ácidos nucleicos y hay que tener en cuenta muchas consideraciones para su correcto diseño (Cultek S.L.U. 2006):

- Longitud del cebador: Viene determinada por el grado de conservación, tamaño y composición de la secuencia diana. Si se elige una secuencia altamente conservada, el tamaño de la sonda es menos restrictivo; por el contrario, si se elige una secuencia muy polimórfica, las secuencias que muestren suficiente conservación limitarán el tamaño de la sonda.

Normalmente, los cebadores empleados para la reacción de amplificación varían entre 15 y 30 pb (en este estudio serán de 20 pb). Hay que tener en cuenta que los cebadores más cortos pueden no proporcionar la adecuada especificidad y los más largos no incrementan la especificidad y son más caros de sintetizar.

- Temperatura de *melting* (Tm) del cebador: Se define como la temperatura a la cual el 50% de los cebadores están unidos y el 50% están en solución. La Tm es dependiente de la concentración de cebador, la composición de la secuencia y de la composición del solvente y es diferente de la temperatura de disociación. Cuando el tamaño de los cebadores está entre las 20-25 pb el efecto de la longitud sobre la Tm disminuye, por lo que el efecto sobre la misma se debería principalmente a la composición del cebador.
Los valores de Tm calculados para los dos cebadores usados en la amplificación deberían ser lo más próximos posible, para evitar la ‘unión asimétrica’ de los mismos, es decir, que uno de los cebadores se una a la secuencia diana con mayor afinidad que el otro bajo las mismas condiciones de hibridación.
- Secuencia: La composición de nucleótidos de los cebadores utilizados determina directamente la temperatura de *annealing* a usar en el protocolo. Para su cálculo hay que tener en cuenta algunos puntos importantes:
 - ❖ Deben evitarse las repeticiones largas del mismo nucleótido que pueden disminuir la especificidad de la diana.
 - ❖ El contenido G+C de los cebadores debe aproximarse, o superar ligeramente, al contenido de G+C de la diana, ya que los cebadores deficientes en G+C que flanquean dianas ricas en G+C pueden no competir efectivamente por la unión, lo cual originaría una baja eficiencia de amplificación.
 - ❖ Hay que tener en especial consideración el extremo 3’ de los cebadores, ya que es el extremo reconocido por la polimerasa. Una elevada proporción de residuos de G+C en 3’ podría originar una baja especificidad debido a la tendencia de estas regiones a proporcionar uniones muy estables con secuencias inespecíficas.
- Características físicas: Debe evitarse el *auto-annealing* (formación de horquillas o lazos) ya que reduce la concentración efectiva de los cebadores al producirse una competencia entre la unión de los cebadores entre sí y la diana.
- Interacciones cebador-cebador: Se refiere a la acumulación de productos pequeños de PCR que miden aproximadamente igual que dos cebadores unidos uno a continuación de otro. Estos artefactos, en elevada concentración, pueden disminuir la sensibilidad de la reacción al competir por los componentes de la misma.
- Concentración de los cebadores: Si la concentración de los cebadores es baja puede ocasionar un rendimiento pobre de la reacción. Si por el contrario es demasiado alta, puede ocasionar una disminución de la especificidad que se manifiesta por un incremento de los productos de

amplificación inespecíficos; además esto podría favorecer la aparición de dímeros de cebador.

En este estudio, los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de referencia de los genes *HCN4* y *CYP3A4* de *H. sapiens*, que están recogidas en Pubmed con número de referencia GRCh37.p13, NC_000015.9 GI:224589806 13-AUG-2013 y GRCh37.p13, NC_000007.13 GI:224589819 13-AUG-2013, respectivamente.

El diseño de los cebadores se realizó mediante el programa informático *Primer3* (Untergasser A *et al* 2012) fijando la longitud de los mismos en 20 pb y la cantidad de GC en torno al 55-60% para cada par de cebadores. Los cebadores obtenidos se reflejan en tablas que se encuentran en el apartado de Resultados (Tabla 5 y 6). La síntesis de los cebadores fue llevada a cabo por Invitrogen (Life Technologies Carlsbad-California).

Después de la elección y diseño de los cebadores, el siguiente paso para incrementar la sensibilidad y especificidad de la reacción consistió en la optimización del resto de parámetros de la misma.

- Temperatura de *annealing*: Su optimización es particularmente importante según aumenta la complejidad genética de la muestra. Una mayor complejidad favorece el *annealing* inespecífico y bajo condiciones no muy estrictas la baja especificidad puede provocar la amplificación de productos inespecíficos que se observarían en los geles como bandas de pesos moleculares superiores o inferiores a los esperados.

La temperatura óptima de *annealing* para un protocolo a menudo es superior a la predicha matemáticamente. Como regla general se empieza por la temperatura obtenida de dichas fórmulas y se va jugando con ella aumentando o disminuyendo la misma hasta obtener el producto deseado.

- Concentración de Mg^{+2} : El aumento de la $[Mg^{+2}]$ tiene el efecto neto de disminuir la severidad de la unión de los cebadores y, por lo tanto, una baja especificidad de la reacción; las bajas $[Mg^{+2}]$ pueden originar una pobre eficiencia de la reacción.

La $[Mg^{+2}]$ debe calcularse como función de la concentración de nucleótidos; para la mayoría de los protocolos, debe probarse un rango de $[Mg^{+2}]$ entre 0,5 y 3,0 mM por encima de la concentración de nucleótidos. Hay que destacar que dependiendo de la *Taq* polimerasa que estemos testando esta ya puede venir con una $[Mg^{+2}]$ determinada.

- Desoxinucleótidos Trifosfato (dNTPs): La concentración óptima de dNTPs debe determinarse empíricamente y conjuntamente con la $[Mg^{+2}]$. De forma general la [dNTPs] varía entre 20 y 200 mM, teniendo en cuenta que concentraciones muy altas pueden disminuir la especificidad y, por el contrario, concentraciones demasiado bajas pueden

provocar un bajo rendimiento de los productos de amplificación. Al igual que el Mg^{+2} , los dNTPs también pueden venir junto con la *Taq* polimerasa.

- Elección y concentración de la enzima: Las concentraciones de las diferentes polimerasas utilizadas en la PCR varían significativamente. Para optimizar la concentración de la enzima, se debe testar empíricamente el protocolo variando la concentración entre 0,5 y 5,0 U por cada 100 μ L de reacción. Hay que tener en cuenta que concentraciones muy elevadas de la enzima pueden producir la unión inespecífica de los cebadores y cuando es demasiado baja disminuye la eficiencia de la amplificación (Cultek S.L.U. 2006).

En este proyecto se realizó la optimización de las PCRs con tres *Taq* polimerasa diferentes, procedente de tres casas comerciales distintas; *KAPA2GTM FastHotStart ReadyMix* (Kapa Biosystem-Boston Estados Unidos), *MyTaqTM DNA Polymerase* (Bioline-Paris Francia) y *Green Taq polymerase* (GenSript-Madrid España). Las condiciones empleadas para las PCRs con cada tipo de *Taq* polimerasa se detallan en las siguientes tablas (Tabla 1, 2 y 3). Aunque las primeras pruebas con las tres *Taq* se realizaron a un volumen final de 25 μ L, siguiendo las instrucciones del fabricante, en ensayos posteriores se demostró que realizando las PCRs en un volumen final de 12,5 μ L resultaba igualmente efectiva la amplificación y suficiente para las reacciones de secuencia, razón por la cual, aunque en los protocolos se detallan los cálculos para ambos volúmenes, finalmente se optimizaron a 12,5 μ L, aumentando así la cantidad de PCRs a realizar con cada *kit*.

PCR	STOCK	FINAL	Vf= 25 μ L	Vf= 12,5 μ L	PROTOCOLO		
					T ^a	Tiempo	
Buffer	10x	1x	2,5 μ L	1,25 μ L	PCR (x 40 ciclos)	95°	3 min
dNTPs	10 mM	1,25 mM	3,125 μ L	1,56 μ L		95°	20 s
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5 μ L	0,75 μ L		Variable	20 s
Taq	5 U/ μ L	1U/ μ L	0,5 μ L	0,25 μ L		72°	20 s
Primer Fw	10 μ M	0,1 μ M	0,25 μ L	0,125 μ L		Extensión	72°
Primer Rv	10 μ M	0,1 μ M	0,25 μ L	0,125 μ L			
ADN	20 ng/ μ L	2 ng/ μ L	2,5 μ L	1,25 μ L			
Agua	csp	csp	14,375 μ L	7,19 μ L			

Tabla 1. Condiciones para la amplificación de ADN genómico empleando la *Taq* polimerasa de *Bioline*.

PCR	STOCK	FINAL	Vf= 25 μ L	Vf= 12,5 μ L	PROTOCOLO		
					T ^a	Tiempo	
Buffer	10x	1x	2,5 μ L	1,25 μ L	PCR (x 30 ciclos)	94°	3 min
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	2 μ L	1 μ L		94°	20 s
Taq	5 U/ μ L	1,25-5 U	0,5 μ L	0,25 μ L		Variable	40 s
Primer Fw	10 μ M	0,2-0,6 μ M	0,5 μ L	0,25 μ L		72°	45 s
Primer Rv	10 μ M	0,2-0,6 μ M	0,5 μ L	0,25 μ L		Extensión	72°
ADN	20 ng/ μ L	2 ng/ μ L	2,5 μ L	1,25 μ L			
Agua	csp	csp	16,5 μ L	8,25 μ L			

Tabla 2. Condiciones para la amplificación de ADN genómico empleando la *Taq* polimerasa de *GenSript*. Los números en rojo indican las concentraciones empleadas dentro del rango sugerido por el fabricante.

PCR	STOCK	FINAL	Vf= 25 μ L	Vf= 12,5 μ L	PROTOCOLO		
					T ^a	Tiempo	
Buffer+dNTPs+Taq	2x	1x	12,5 μ L	6,25 μ L	PCR (x 35 ciclos)	95°	3 min
Primer Fw	10 μ M	0,5 μ M	1,25 μ L	0,63 μ L		95°	15 s
Primer Rv	10 μ M	0,5 μ M	1,25 μ L	0,63 μ L		Variable	15 s
ADN	20 ng/ μ L	2 ng/ μ L	2,5 μ L	1,25 μ L		72°	10 s
Agua	csp	csp	csp	3,74 μ L		Extensión	72°

Tabla 3. Condiciones para la amplificación de ADN genómico empleando la *Taq* polimerasa de *Kapa Biosystem*.

Las amplificaciones a partir de ADN genómico se realizaron en un termociclador *Veriti™ Dx Thermal Cycler* (Applied Biosystem) a partir de 25 ng de ADN molde en presencia de las tres *Taq* polimerasa distintas. En todas las pruebas se incluyó un control negativo (CN) para descartar la presencia de contaminaciones en la realización de la PCR.

4.3 Separación electroforética de los productos amplificados por PCR y visualización.

Con el fin de comprobar que la reacción de amplificación se ha llevado a cabo correctamente se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando marcadores de peso molecular *HyperLadder IV* (Bioline) que tiene un rango de 100 a 1000 pb como referencia. El gel se tiñó con SYBR Green (4 µL) y la visualización de los resultados se efectuó mediante la exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador, captando la imagen resultante mediante el programa Laser 3000 conectado al transiluminador.

4.4 Purificación de ADN.

Los fragmentos de ADN resultantes de las amplificaciones fueron purificados mediante el tratamiento con *illustra™ ExoProStar™ 1-Step* (Life Science Lutterworth-Reino Unido), que es un *kit* optimizado para purificar PCR y consiste en mezclar 0.6 µL de ExoProStar 1-Step con 1.5 µL de la reacción de PCR a purificar e incubar a 37°C 15 minutos, seguida de otra incubación a 80°C durante otros 15 minutos para inactivar las enzimas (Figura 7).

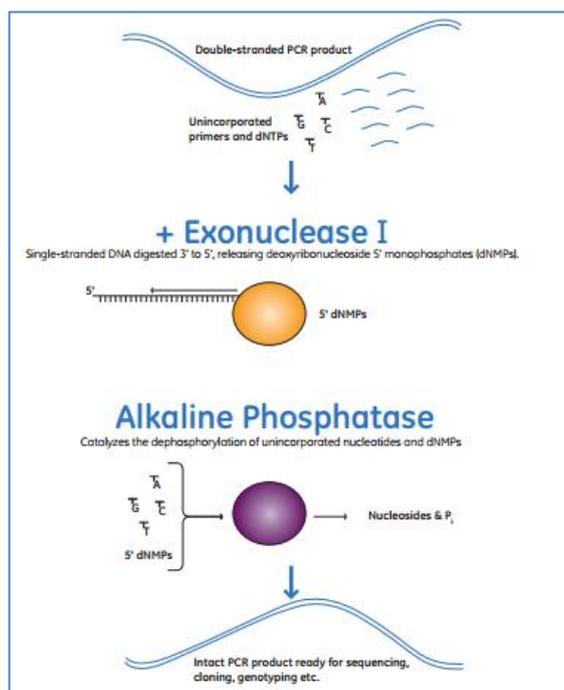


Figura 7. Representación esquemática de purificación de las PCRs (Imagen modificada de Life Science)

4.5 Reacción de secuenciación de ADN.

Para las reacciones de secuenciación se empleó el *BigDye® Terminator V3 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem Madrid-España). La mezcla de reacción (Tabla 4) y las condiciones de PCR se hicieron siguiendo los protocolos indicados por el fabricante y consistió en una reacción de secuencia para cada fragmento de interés en sentido *Forward* y *Revers*, puesto que la secuenciación en ambas direcciones permite obtener una mayor calidad en los resultados.

Reacción de Secuenciación	Vf=10 µL
Agua	6 µL
Buffer	2 µL
Bigdye	0,5 µL
Primer (Fw o Rv)	0,5 µL
PCR-Exo	1 µL

Tabla 4. Mezcla de reacción de secuenciación de ADN.

4.6 Purificación de la reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación se purificó con *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit* (Millipore Darmstadt-Alemania). El *kit* está provisto de una placa, en los pocillos de la cual se deben pipetear las reacciones de secuencias que se desean purificar. La placa se somete a vacío junto con una solución para eliminar sales contaminantes y restos de tintes terminadores que hayan quedado como residuos en las reacciones de secuenciación de ADN (Figura 8).

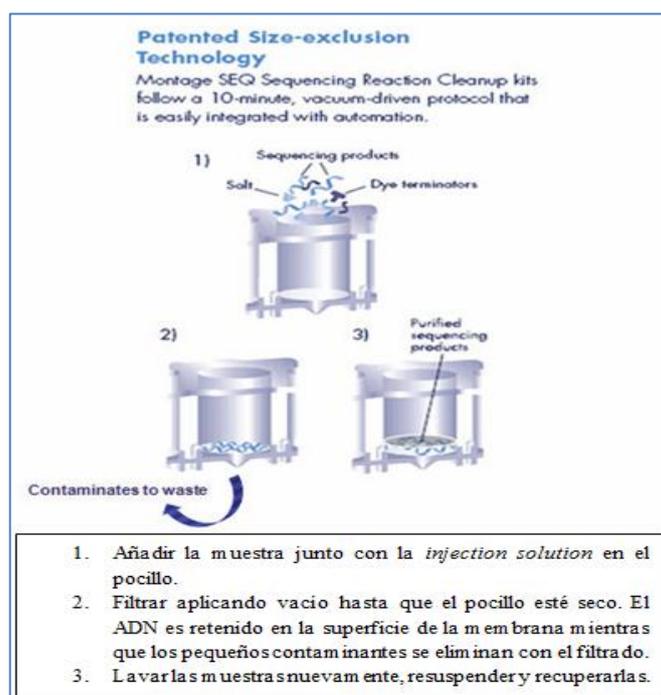


Figura 8. Montaje *SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup kits* (Imagen modificada Biotek)

4.7 Electroforesis capilar.

La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático *Abi Prism® 3730* (Applied Biosystems Madrid-España) de 48 capilares. Para ello previamente se trasvasaron las muestras de la placa de purificación a una bandeja óptica de 96 pocillos (Applied Biosystems Madrid-España) que centrifugamos para eliminar cualquier posible burbuja de aire presente en las muestras y que pudiese interferir con la electroforesis. A continuación colocamos la bandeja en el inyector automático del secuenciador y configuramos los parámetros y condiciones de la electroforesis. Este tipo de secuenciación se basa en un sistema capilar para hacer la separación de los fragmentos de distinto tamaños. Los capilares se caracterizan por tener un diámetro pequeño ($\approx 200 \mu\text{m}$) y permiten hacer una separación rápida de alta resolución sin calentar la muestra (Huang y Mathies, 1994).

4.8 Análisis de secuencias.

Las secuencias se analizaron utilizando el programa informático *Variant Reporter* (Applied Biosystem Madrid-España) en el cual cargamos los electroferogramas de nuestras muestras, obtenidos mediante la electroforesis capilar. Para analizar los resultados, comparamos nuestras secuencias de estudio con la secuencia codificante (CDS) e intrónicas de referencia que previamente también se han descargado en el programa, a partir de los archivos .gb obtenidos de PubMed. De esta manera pudimos analizar si existían diferencias entre ambas y así determinar la presencia de variantes de interés.

5. RESULTADOS.

5.1 Diseño de cebadores.

Como ya se mencionó en el apartado de material y métodos; el diseño de cebadores se llevó a cabo con el programa *Primer3* fijando la longitud del cebador en 20 pb y un contenido de GC en torno al 55-60%.

5.1.1 Diseño de cebadores para el gen *HCN4*.

En la figura 9 se observan los cebadores obtenidos para los exones 2,3,4,7 y 5+6 del gen *HCN4*. Para los exones 5 y 6 se diseñó un solo par de cebadores debido a que son exones pequeños y la suma de ambos no supera las 1000 pb. En azul se muestra el cebador *Forward* (Fw) seleccionado por el programa, en verde la región a amplificar que consta del exón

correspondiente más 20 pb de cada uno de los intrones flanqueantes y en amarillo el cebador *Revers* (Rv).

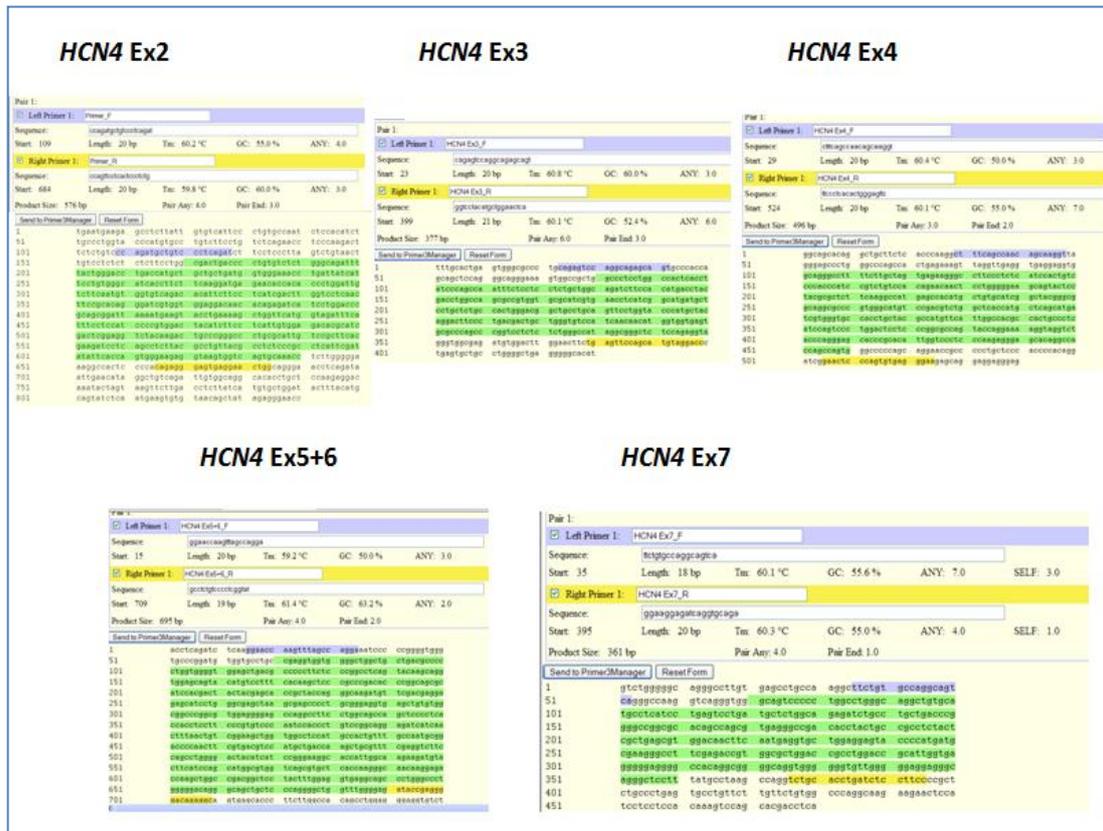


Figura 9. Diseño de cebadores para amplificación de los exones 2,3,4,5+6 y 7 del gen *HCN4* con el programa *Primer3*.

Sin embargo, el diseño de cebadores para algunos exones, como el Exón1 y el Exón 8 del gen *HCN4*, no se pudo realizar con este programa por lo que hubo que recurrir a otras alternativas.

En el caso del Ex 1; primero se intentó su diseño con el programa *Primer3* pero no se obtuvo resultado, razón por la cual se utilizaron para las primeras pruebas cebadores encontrados en la bibliografía (Ueda K *et al* 2009) (Figura 10).

Table 1. PCR primers used in the analysis of genomic gene for human *HCN4* (5' → 3')

Exon	Forward primer	Reverse primer	PCR product (bp)
1.1	TGGCGCCATGGACAAGCTGC	AAGCGCCTCGAGTCGCCGTT	295
1.2	GCGGGCAAGTCCAGCACGAA	CGGGCCTCCTCCACTTTGA	334
1.3	AGCAGCCCTCGGTGGACA	ACCCACAGGATCATEGCTGT	278

Figura 10. Selección de cebadores empleados en la bibliografía cebadores para el exón 1 de *HCN4*. Se seleccionaron aquellos que permitan hacer tres PCRs en una.

En pruebas posteriores se demostró que los cebadores seleccionados no amplificaban correctamente las regiones de interés ya que no aparecía una banda nítida en los geles (Figura 11).

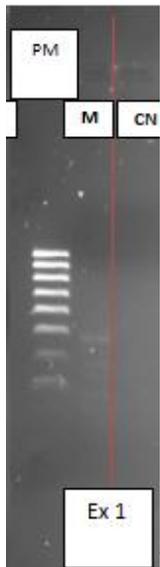


Figura 11. Gel de prueba con los cebadores de la bibliografía para *HCN4* exón 1.

Se realizó un alineamiento de los cebadores del exón 1 del gen *HCN4* contra la secuencia del genoma humano (versión GRCh37.p13) con el fin de comprobar que no estuviesen alineando otra zona del genoma con el programa Blat de UCSC Genome Browser. Tal y como se ve en la figura 12, los cebadores del exón 1 sólo se alinean con la región de interés en el cromosoma 15.

Human BLAT Results											
BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser	details	YourSeq	22	19	40	40 100.0%	15	+	73659795	73659816	22
browser	details	YourSeq	20	1	20	40 100.0%	15	-	73660599	73660618	20

Figura 12.BLAT para *HCN4* Ex1

A pesar de que el Blat indicaba que no se producía alineamiento múltiple, no se logró amplificar el exón con los cebadores iniciales, razón por la cual se decidió volver a diseñar los cebadores para el exón 1 con el programa *Primer express* (Figura 13).

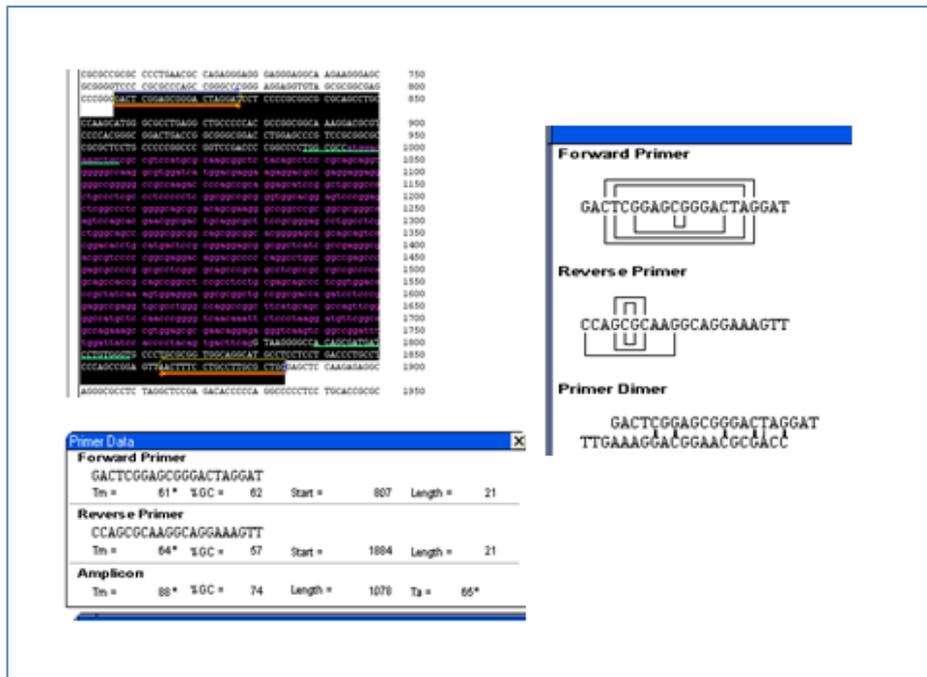


Figura 13. Diseño de nuevos cebadores para el exón 1 del gen *HCN4* con el programa *Primer express*.

Para el exón 8, debido a su gran tamaño y a que para que una amplificación sea de buena calidad el tamaño del amplicón no debería ser mayor a las 1000 pb se dividió el mismo en dos fragmentos que se denominaron Ex 8A y Ex 8B, para las cuales se diseñaron cebadores con el programa *Primer3* (Figura 14).

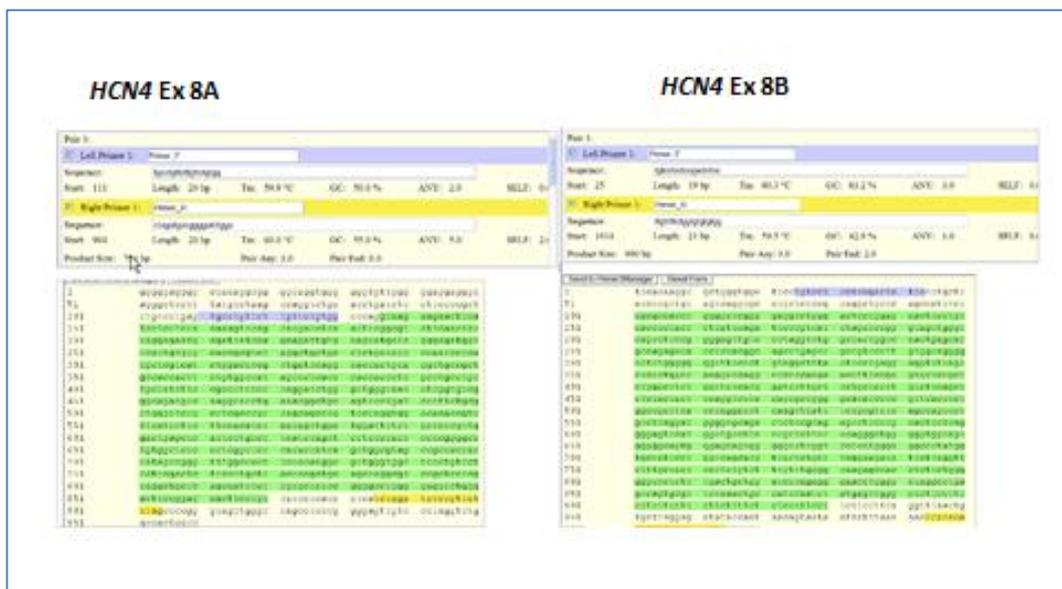


Figura 14. Diseño de cebadores para amplificación del exón 8 del gen *HCN4* con el programa *Primer3*.

En pruebas posteriores se demostró que los cebadores diseñados para el exón 8A no amplificaban correctamente las regiones de interés ya que no aparecía una banda nítida en los geles (Figura 15).

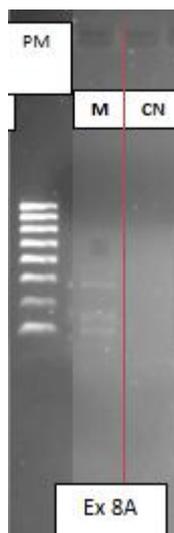


Figura 15. Gel de prueba con los cebadores diseñados con *Primer3* para *HCN4* exón 8A.

Se realizó un alineamiento de los cebadores del exón 8A del gen *HCN4* contra la secuencia del genoma humano (versión GRCh37.p13) con el fin de comprobar que no estuviesen alineando otra zona del genoma con el programa Blat de UCSC Genome Browser. En este caso, los cebadores del exón 8A alinean no solo con la región de interés del cromosoma 15 sino que también lo hacen con una zona del cromosoma 7 lo que podría explicar los problemas surgidos al realizar esta PCR (Figura 16).

Human BLAT Results											
BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser	details	YourSeq	22	19	40	40 100.0%	15	+	73615520	73615541	22
browser	details	YourSeq	21	1	21	40 100.0%	15	-	73616295	73616315	21
browser	details	YourSeq	20	4	23	40 100.0%	7	+	127775136	127775155	20

Figura 16. BLAT para *HCN4* Ex 8A.

A la vista del Blat se decidió volver a diseñar los cebadores para el exón 8A con el programa *Primer express* (Figura 17).

Por otra parte, el exón 8B no se lograba optimizar probablemente por su gran tamaño, razón por la cual se dividió en dos, Ex 8B y 8C, y se diseñaron los cebadores con el programa *Primer express* (Figura 17).



Figura 17. Diseño de nuevos cebadores para los exones 8A, 8B y 8C del gen *HCN4* con el programa *Primer express*.

En la tabla 5 se muestran los cebadores que se emplearon para las reacciones de PCR y el tamaño del amplicón para cada par de cebadores seleccionado para la amplificación de los exones del gen *HCN4*.

FRAGMENTO	Secuencia Primer (5' → 3')	Tamaño amplicón
HCN4 Ex1 Fw	GACTCGGAGCGGGACTAGGAT	1078 nt
HCN4 Ex1 Rv	CCAGCGCAAGGCAGGAAAGTT	
HCN4 Ex2_F	CCAGATGCTGTCCCTCAGAT	576 nt
HCN4 Ex2_R	CCAGTTCCTCACTCCCTCTG	
HCN4 Ex3_F	CAGAGTCCAGGCAGAGCAGT	377 nt
HCN4 Ex3_R	GGTCCATACATGCTGGAACTCA	
HCN4 Ex4_F	CTTTCAGCCAACAGCAAGGT	496 nt
HCN4 Ex4_R	TTCCTCACACTGGGAGTTC	
HCN4 Ex5+6_F	GGAACCAAGTTTAGCCAGGA	695 nt
HCN4 Ex5+6_R	GCCTCTGTCCCCTCGGTAT	
HCN4 Ex7_F	TTCTGTGCCAGGCAGTCA	361 nt
HCN4 Ex7_R	GGAAGGAGATCAGGTGCAGA	
HCN4 Ex8A Fw	CTTTATGCCTAAGCCAGGTCT	847 nt
HCN4 Ex8A_R	CTAGATGACGGGGATCTGGA	
HCN4 Ex8B1_F	AACAGCTGGCTGGATTCTCTGC	578 nt
HCN4 Ex8B1_Rv	CAAGGATCCGTGGGAGCCAGA	
HCN4 Ex8C_F	CTCCCCTGTAGGCTTTACTC	724 nt
HCN4 Ex8C_Rv	CCTGGTTATTTCTGCTGTCTT	

Tabla 5. Cebadores diseñados para llevar a cabo la amplificación, mediante PCR convencional, de los exones del gen *HCN4*.

5.1.2 Diseño de cebadores para el gen *CYP3A4*.

En la figura 18 se observan los cebadores obtenidos para los SNP *22 y *1G del gen *CYP3A4*.

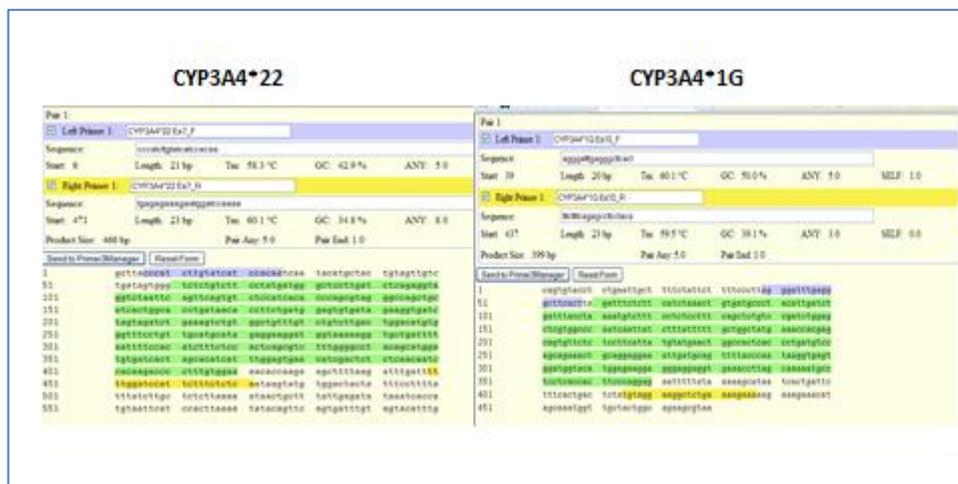


Figura 18. Diseño de cebadores para SNP *22 y *1G del gen *CYP3A4*.

Para la amplificación del SNP *CYP3A4*1B*, también se diseñaron los cebadores con este programa (Figura 19). Sin embargo, como veremos en el siguiente apartado, no se logró la optimización de la PCR con estos cebadores ya que no amplificaban la secuencia correcta, razón por la cual finalmente se decidió utilizar los cebadores descritos previamente en la bibliografía por He *et al* (Figura 20) ya que con estos se lograba amplificar correctamente la zona de interés.

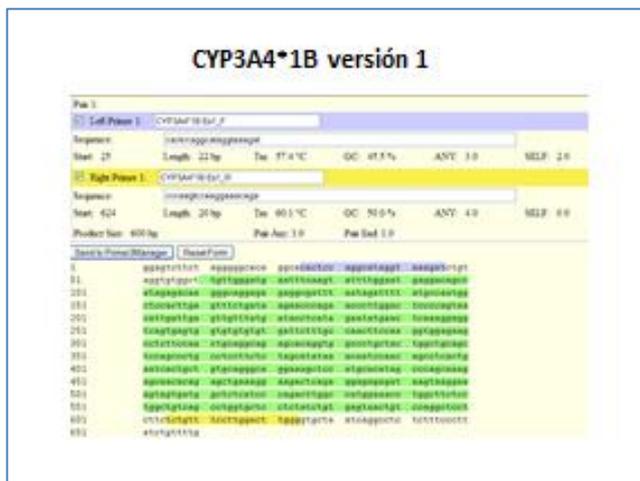


Figura 19. Diseño de cebadores para *CYP3A4*1B* versión 1 del gen *CYP3A4* con *Primer3*

Primer pair	Location	Sequence (5'-3')	Product position in reference gene	Annealing temperature
P1	<i>CYP3A4</i> 5'-region	CCAACAGAATCACAGAGGCCAGC CTCTGAGTCTTCCTTCAGCTCTGTG	-934 to -27*	64.6°C

Figura 20. Cebadores obtenidos del artículo de He *et al* para la amplificación del SNP *1B_He del gen *CYP3A4*.

En la tabla 6 se muestran los cebadores que se emplearon para las reacciones de PCR y el tamaño del amplicón para cada par de cebadores seleccionado para la amplificación de los SNPs del gen *CYP3A4*.

FRAGMENTO	Secuencia Primer	Tamaño amplicón
CYP3A4*1B y F_F	CCAACAGAATCACAGAGGACCAGC	908 nt
CYP3A4*1B y F_R	CTCTGAGTCTTCCTTTTCAGCTCTGTGT	
CYP3A4*22 Ex7_F	CCCATCTTGATCATCCACAA	466 nt
CYP3A4*22 Ex7_R	TGAGAGAAAGAATGGATCCAAAA	
CYP3A4*1G Ex10_F	AGGGATTTGAGGGCTTCACT	399 nt
CYP3A4*1G Ex10_R	TTTCTTTTCAGAGCCTTCCTACA	

Tabla 6. Cebadores diseñados para llevar a cabo la amplificación, mediante PCR convencional, de los SNPs del gen *CYP3A4*.

5.2 Optimización de las PCRs.

Se realizaron pruebas a partir del ADN genómico de cada paciente, utilizando los cebadores diseñados y siguiendo los protocolos descritos para cada una de las tres *Taq* polimerasas testadas (*MyTaqTM DNA Polymerase* de Bioline, *Green Taq polymerase* de GenSript y *KAPA2GTM FastHotStart ReadyMix* de Kapa Biosystem) para comprobar con cual se conseguía la optimización de todas las PCRs. Hay que destacar que en todas las pruebas realizadas siempre se incluyó un control negativo (CN) para verificar la ausencia de contaminaciones.

5.2.1 Optimización PCRs gen *HCN4*.

En el caso de los exones 2, 3, 4 y 5+6 del gen *HCN4* se logró la optimización de las PCRs con las tres *Taq* polimerasas probadas (Figura 21).

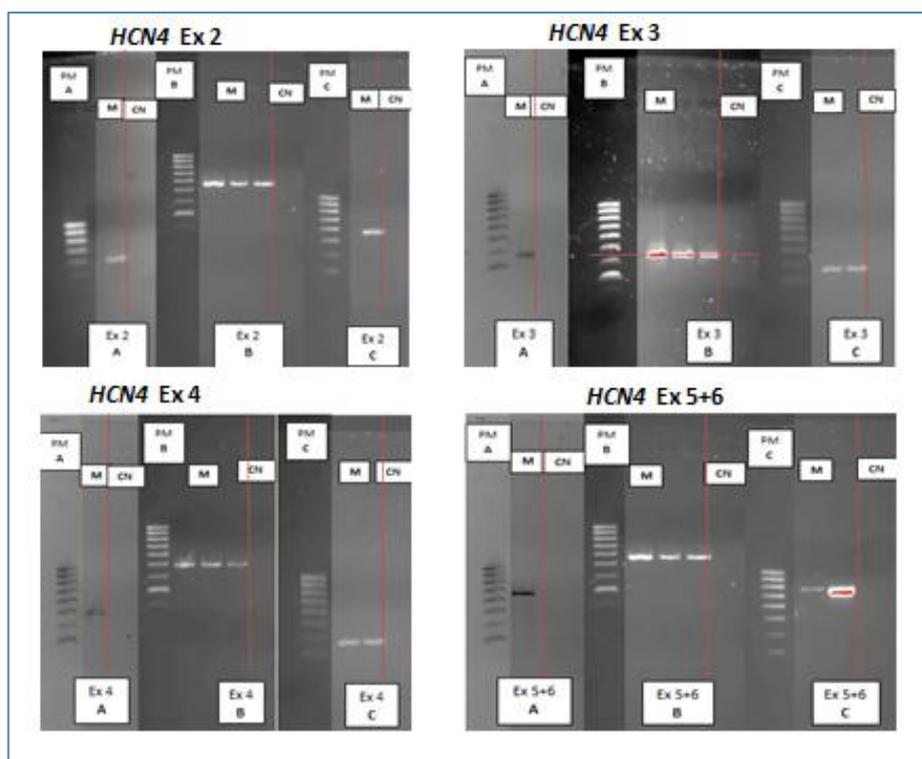


Figura 21. PCRs para los exones 2,3,4 y 5+6 del gen *HCN4* con las tres *Taq*. **PM A** Peso Molecular *Taq* Bioline, **A** *Taq* Bioline, **PM B** Peso Molecular *Taq* Genscript, **B** *Taq* Genscript, **PM C** Peso Molecular *Taq* Kapa Biosystem, **C** *Taq* Kapa Biosystem, **M** indica la muestra y **CN** el control negativo para testar cada una de las PCRs.

Por otra parte, para los exones 1, 7, 8A, 8B Y 8C de *HCN4* solo consiguió optimizarse la reacción de amplificación, con *KAPA2GTM FastHotStart ReadyMix* de Kapa Biosystem (Figura 22); con las peculiaridades de que, en el caso del exón 1 hubo que aumentar el número de ciclos a 40 y que en todos los casos, excepto para el exón 8C hubo que variar la temperatura de *annealing* para conseguir la unión óptima de los cebadores a la secuencia diana (Tabla 7).

Fragmento	Temperatura óptima de <i>annealing</i>
Ex 1	62°C
Ex 2	60°C
Ex 3	60°C
Ex 4	60°C
Ex 5+6	60°C
Ex 7	61°C
Ex 8A	59°C
Ex 8B	63°C
Ex 8C	60°C

Tabla 7. Temperatura óptima de *annealing* para cada exón de *HCN4* con la *Taq* polimerasa de Kapa Biosystem.

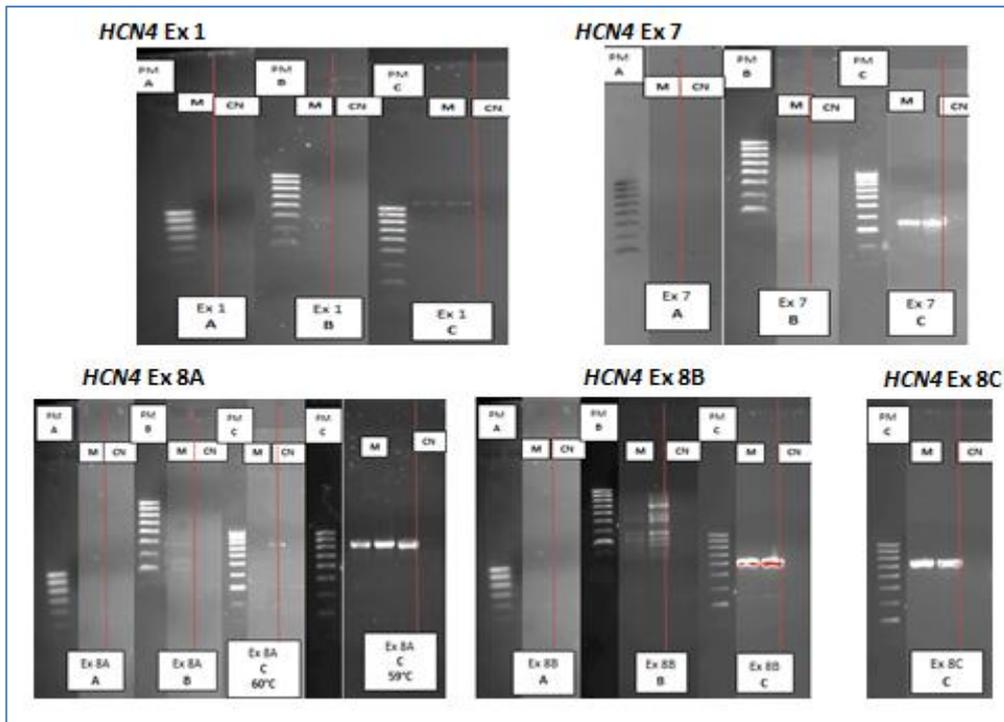


Figura 22.PCRs para los exones 1, 7, 8A, 8B y 8C del gen *HCN4* con las tres *Taq*. Ejemplo de variación de la temperatura de *annealing* con el exón 8A. **PM A** Peso Molecular *Taq* Bioline, **A** *Taq* Bioline, **PM B** Peso Molecular *Taq* Genscript, **B** *Taq* Genscript, **PM C** Peso Molecular *Taq* Kapa Biosystem, **C** *Taq* Kapa Biosystem, **M** indica la muestra y **CN** el control negativo para testar cada una de las PCRs

5.2.2 Optimización PCRs gen *CYP3A4*.

En el caso del SNP *CYP3A4**1G exón 10 se logró la optimización de las PCRs con las tres *Taq* polimerasas probadas (Figura 23).

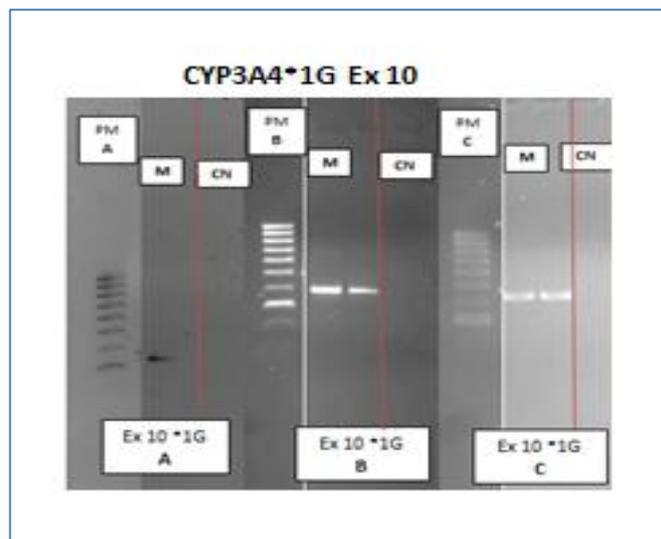


Figura 23.PCRs para el SNP *1G exón 10 de *CYP3A4* con las tres *Taq*. **PM A** Peso Molecular *Taq* Bioline, **A** *Taq* Bioline, **PM B** Peso Molecular *Taq* Genscript, **B** *Taq* Genscript, **PM C** Peso Molecular *Taq* Kapa Biosystem, **C** *Taq* Kapa Biosystem, **M** indica la muestra y **CN** el control negativo para testar cada una de las PCRs.

En el caso del SNP *1B del gen *CYP3A4*, se logró la optimización de las PCRs, con la *Taq* polimerasa de Kapa Biosystem, después de cambiar los cebadores por los que aparecían en la bibliografía consultada (He *et al* 2005) (Figura 24).

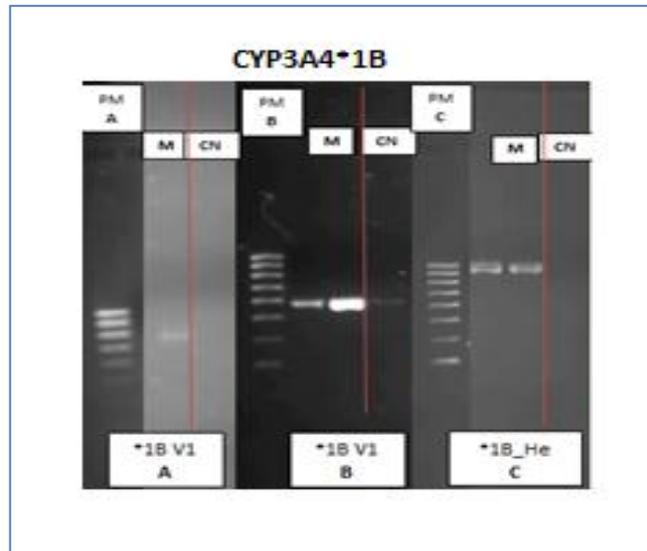


Figura 24.PCRs para el SNP *1B de *CYP3A4* con las tres *Taq*.**PM A** Peso Molecular *Taq* Bioline, **A** *Taq* Bioline, **PM B** Peso Molecular *Taq* Genscript, **B***Taq* Genscript, **PM C** Peso Molecular *Taq* Kapa Biosystem, **C***Taq* Kapa Biosystem, **M** indica la muestra y **CN** el control negativo para testar cada una de las PCRs.

En el último SNP, el *22 del gen *CYP3A4* se logró optimizar con *Green Taq polymerase* de GenSript y *KAPA2GTM FastHotStart ReadyMix* de Kapa Biosystem, con la peculiaridad de que, en el caso de la *Taq* polimerasa de GenScript hubo que aumentar la cantidad de cebador 4 veces para obtener producto y empleando la *Taq* polimerasa de Kapa Biosystem solo fue necesario aumentarla 2 veces (Figura 25).

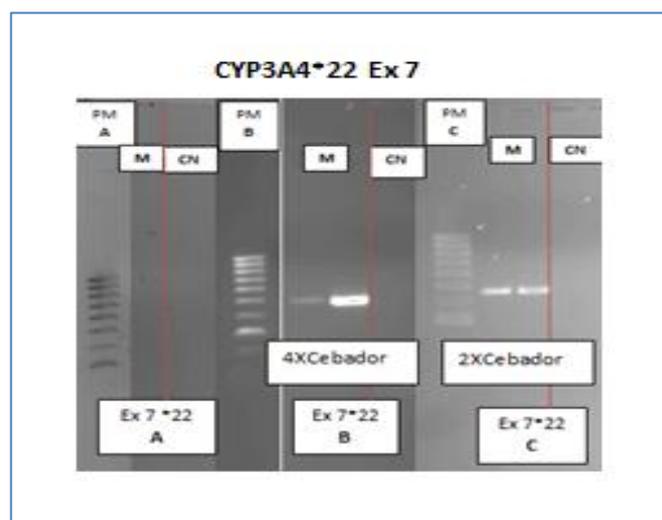


Figura 25.PCRs para *CYP3A4**22 con las tres *Taq*.**PM A** Peso Molecular *Taq* Bioline, **A** *Taq* Bioline, **PM B** Peso Molecular *Taq* Genscript, **B***Taq* Genscript, **PM C** Peso Molecular *Taq* Kapa Biosystem, **C***Taq* Kapa Biosystem, **M** indica la muestra y **CN** el control negativo para testar cada una de las PCRs.

A continuación la tabla 8 muestra las temperaturas de *annealing* optimizadas para los SNPs de *CYP3A4*.

Fragmento	Temperatura óptima de <i>annealing</i>
CYP3A4*1B	64°C
CYP3A4*22	57°C
CYP3A4*1G	60°C

Tabla 8. Temperatura óptima de *annealing* para cada exón de *HCN4* con la *Taq* polimerasa de Kapa Biosystem.

5.3 Secuenciación.

Con el fin de analizar las secuencias obtenidas para cada paciente, se compararon los electroferogramas obtenidos de la reacción de secuencia con las secuencias de referencia de cada uno de los genes en el programa *Variant Reporter* (Applied Biosystem).

5.3.1 Resultados obtenidos en el gen *HCN4*.

Se llevó a cabo el análisis de las secuencias obtenidas de 11 pacientes (110 fragmentos analizados). Las variantes encontradas tras el análisis son:

- **L12L:** Esta variante se encontró en la posición genómica g1030C>G en el exón 1. De los once pacientes analizados solo se ha detectado en uno y se encontraba en heterocigosis (Figura 26).

Dicha variante se recoge en la base dbSNP como rs201193660 y se ha descrito una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.011.

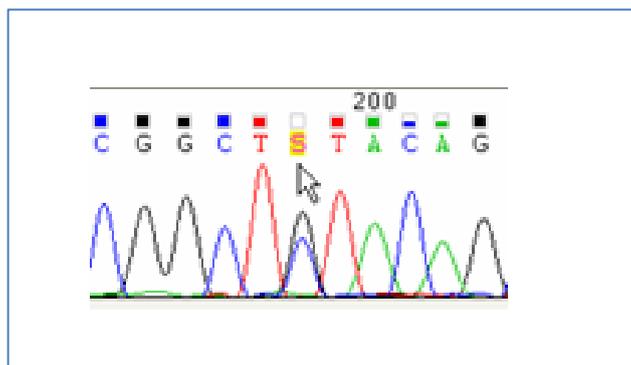


Figura 26. Variante L12L hallada en heterocigosis en el exón 1 de uno de los pacientes analizados.

- **L520L:** Esta variante sinónima se encontró en la posición genómica g39660C>T en el exón 4. Solo ha sido detectada en uno de los 11 pacientes analizados y se encontraba en heterocigosis (Figura 27).

Dicha variante se recoge en la base dbSNP como rs12909882. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.0501 y una frecuencia en heterocigosis de 0.132.

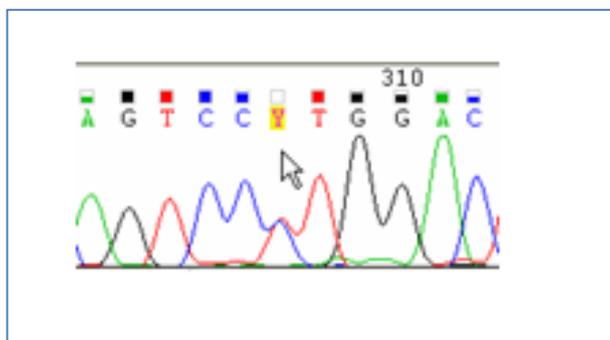


Figura 27. Variante L520L hallada en heterocigosis en el exón 4 de uno de los pacientes analizados.

- **P852P:** Esta variante se encontró en la posición genómica g45728G>C en el exón 8A. Solo ha sido detectada en uno de los 11 pacientes analizados y se encontraba en heterocigosis (Figura 28).

Dicha variante se recoge en la base dbSNP como rs117819825. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.0135 y una frecuencia en heterocigosis de 0.076.

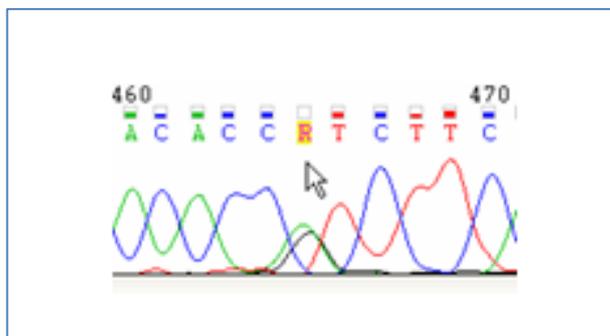


Figura 28. Variante P852P hallada en heterocigosis en el exón 8A de uno de los pacientes analizados.

- **P1200P:** Esta variante se encontró en la posición genómica g46772A>G en el exón 8C. Ha sido detectada en seis de los 11 pacientes analizados encontrándose en heterocigosis (Figura 29) en dos de ellos y en homocigosis en cuatro (Figura 30).

Dicha variante se recoge en la base dbSNP como rs529004. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.1479 y una frecuencia en heterocigosis de 0.264.

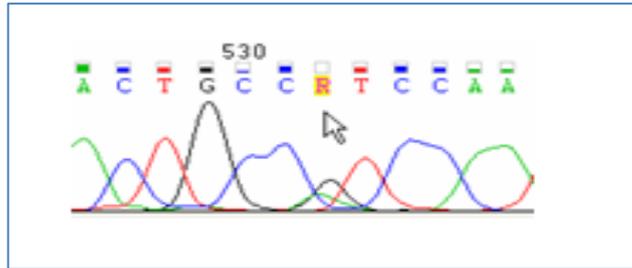


Figura 29. Variante P1200P hallada en heterocigosis en el exón 8C en dos de los pacientes analizados.

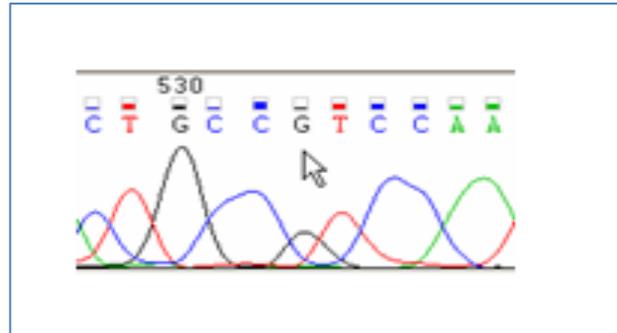


Figura 30. Variante P1200P hallada en homocigosis en el exón 8C en cuatro de los pacientes analizados.

5.3.2 Resultados obtenidos en el gen *CYP3A4*.

Se llevó a cabo el análisis de las secuencias obtenidas de 11 pacientes (33 fragmentos): 30 fragmentos analizados. Quedan 3 fragmentos por analizar debido a que no se ha conseguido un electroferograma limpio que permita observar la secuencia:

- **CYP3A4*1B:** Esta variante corresponde con la numeración genómica g716A>G en la región flanqueante 5'. A falta de dos pacientes por analizar, esta variante no ha sido encontrada en ninguno de los pacientes analizados (Tabla 9).

Esta variante se recoge en la base dbSNP como rs2740574. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.201 y una frecuencia en heterocigosis de 0.289.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AA	AA	AA	AA	AA	AA		AA		AA	AA

Tabla 9. Observaciones para cada uno de los pacientes analizados.

- **CYP3A4*22:** Esta variante corresponde con la numeración genómica g16496C>T en el intrón 6. No ha sido encontrada en ninguno de los 11 pacientes analizados (Tabla 10).

Esta variante se recoge en la base dbSNP como rs35599367. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.021 y una frecuencia en heterocigosis de 0.041.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CC										

Tabla 10. Observaciones para cada uno de los pacientes analizados.

- **CYP3A4*1G:** Esta variante se encontró en la posición genómica g21346G>A en el intrón 10. Ha sido encontrada en heterocigosis en dos de los 10 pacientes analizados (Tabla 11). Esta variante se recoge en la base dbSNP como rs2242480. Se ha descrito para la misma una frecuencia del alelo minoritario de la población general de 0.277 y una frecuencia en heterocigosis de 0.335.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GG	GG	GA	GA	GG	GG		GG	GG	GG	GG

Tabla 11. Observaciones para cada uno de los pacientes analizados.

6. DISCUSIÓN.

En este estudio hemos diseñado los cebadores apropiados para amplificar las regiones de interés de los exones codificantes del gen *HCN4* y de los tres SNPs sugeridos para el gen *CYP3A4*. Además hemos conseguido optimizar las reacciones de PCR y de secuenciación. Para ello hemos hecho pruebas con tres enzimas *Taq* polimerasa, descritas en el apartado de material y métodos, pero con la única que hemos conseguido optimizar todas las PCRs ha sido con la enzima *Taq* polimerasa *KAPA2GTM FastHotStart ReadyMix* de Kapa Biosystem. Resulta interesante, en este punto, mencionar la relevancia de la optimización y normalización de los métodos que hemos realizado en esta primera fase del estudio ya que sin estos datos no se podría llevar a cabo la segunda parte del ensayo. Es decir, es importante que los análisis sean reproducibles siempre en las mismas condiciones para poder comparar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas que hemos realizado. A este respecto, resaltar la importancia del uso final de una única *Taq* para la realización de todas las PCRs puesto que esto repercute en un ahorro de tiempo y dinero. También el hecho de que para casi todas las PCRs se realicen con el mismo número de ciclos (excepto una que se lleva a cabo a 40 ciclos), repercute en un ahorro de tiempo puesto que todas se pueden realizar en el mismo termociclador.

Es importante destacar que las optimizaciones se realizaron con ADN genómico extraído de sangre de once pacientes con IC que acababan de iniciar el tratamiento con Ivabradina y que por tanto podrán formar parte de un estudio posterior. En esta primera fase, tal como ya se ha explicado, a partir de las PCRs hemos secuenciado y obtenido electroferogramas que nos han servido para estudiar la presencia de variantes en los genes *HCN4*. Todas las variantes encontradas en esta primera fase tras el análisis de 11 pacientes fueron variantes sinónimas y por tanto, probablemente, no influyen en la respuesta a la Ivabradina. Sin embargo consideramos que en una segunda fase del estudio, con más pacientes, podrían hallarse variantes de interés. Por otra parte también habrá que continuar con el análisis de los polimorfismos del gen *CYP3A4*, ya que en esta primera fase sólo hemos encontrado en heterocigosis en dos de los once pacientes la variante *CYP3A4*1G* y por lo tanto se necesitarán más datos para poder analizar su influencia en la respuesta a la Ivabradina.

La segunda fase de este estudio, que pretende contrastar la hipótesis planteada, se llevará a cabo incluyendo más pacientes con IC con tratamiento, *de novo*, con Ivabradina según las indicaciones establecidas por la EMA (IC crónica de clase II-IV de la NYHA (New York Heart Association) con disfunción sistólica, en ritmo sinusal y $FC \geq 75$ lpm, en asociación con el tratamiento estándar con beta-bloqueantes o cuando el tratamiento con beta-bloqueantes está contraindicado o no se tolera. Dicho estudio consistirá en encontrar una respuesta diferencial de los pacientes a la Ivabradina en función de las variantes presentes en los genes de estudio y, de esta manera quizás abrir la puerta a tratamientos más individualizados.

En los pacientes del estudio se realizará:

- ❖ Extracción de sangre al paciente que se procesará tal como vimos a lo largo de esta primera fase del estudio, en busca de variantes presentes en los genes *HCN4* y *CYP3A4*.
- ❖ Estudio de la FC con la realización de un *Holter* de 24 horas antes del inicio del tratamiento con Ivabradina y otro a los 15 días de haber iniciado el tratamiento.

Tras la realización de la segunda fase de este estudio se podrá comprobar si hay una respuesta farmacogenética diferente en los pacientes con IC a los que se le prescribe Ivabradina.

7. CONCLUSIONES.

Tras la realización de este trabajo podemos concluir que:

- a) La metodología desarrollada ha permitido la identificación polimorfismos en ambos genes.
- b) La metodología desarrollada posibilita el estudio farmacogenético de respuesta a la Ivabradina en nuestro entorno que evalúe la relevancia funcional de estos polimorfismos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Crespo-Leiro MG y Paniagua Martín MJ. **Tratamiento de la insuficiencia cardíaca refractaria o avanzada.** *Rev Esp Cardiol.* 2004;57:869-883.
2. Böhm M, Swedberg K, Komajda M *et al.* **Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial.** *Lancet.* 2010;376:886–894.
3. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. **Current-dependent Block of Rabbit Sino-Atrial Node I_f Channels by Ivabradine.** *J Gen Physiol.* 2002; 120:1-13.
4. Bucchi A, Baruscotti M, Nardini M *et al.* **Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 channels.** *PLoS ONE.* 2013;8: e53132.
5. Cultek S.L.U. **Aplicación_ PCR-Técnica. Amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*.** 2006 Pp. 5-7.
6. Daudén Tello E. **Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio.** *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97:623-629.
7. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, *et al.* **Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.** *Eur Heart J* 2008;10:1093.
8. DiFrancesco D. **Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers.** *Pharmacol Res* 2006;53:399-406.
9. Elens L, Becker ML, Haufroid V, *et al.* **Novel CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study.** *Pharmacogenetics.* 2011;12:861-866.
10. Fox K, Borer JS, Camm AJ, *et al* (2007). **Resting heart rate in cardiovascular disease.** *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50:823-830.
11. He BX, Shi L, Qiu J *et al.* **A functional polymorphism in the CYP3A4 gene is associated with increased risk of coronary heart disease in the Chinese Han population.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2010;108: 208-213.
12. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. **Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance *in vivo*.** *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:373-387.
13. Hernández Herrero G, Moreno González A, Zaragoza García F. *et al.* **Tratado de medicina farmacéutica.** Chap 24. Genética e investigación clínica con fármacos. 1ªed. Buenos Aires: Madrid: Médica Panamericana. 2010 Pp. 292.

14. Heusch G. **Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents.** *Br J Pharmacol.* 2008;153:1589-1601.
15. Huang, X. and R. Mathies (1994) **Application of capillary array electrophoresis to DNA sequencing.** Chapt 3. Automated DNA sequencing and analysis. Edit. Adams, M. C. Fields, J. Venter. Academic Press, Inc. SD, USA. Pp. 17-28.
16. Madej T, Address KJ, Fong JH, *et al.* **MMDB: 3D structures and macromolecular interactions.** *Nucleic Acids Res.* 2012;40 (Database issue):D461-464.
17. Prats G. **Microbiología clínica.** Chap 9. Técnicas genéticas. 1ªed. Buenos Aires: Madrid: Médica Panamericana. 2006 Pp. 195.
18. Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, *et al.* **Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart.** *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45:289-299.
19. Swedberg K, Komajda M, Böhm M, *et al.* **Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study.** *Lancet* 2010;376:875-885.
20. Tamargo J, Lopez-Sendon J. **Novel therapeutic targets for the treatment of heart failure.** *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:536–555.
21. Ueda K, Hirano Y, Higashiuesato Y *et al.* **Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia.** *J Hum Genet* 2009;54:115-121.
22. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012;40:e115
Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 2007;23:1289-1291.
23. Vaquero M, Gómez R, Núñez L *et al.* **Ivabradina, un bloqueador selectivo de la corriente If. Aspectos farmacológicos y tolerabilidad.** *Rev Esp Cardiol* 2007;7:32-45.
24. Wandel C, He H, *et al.* **Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition.** *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:231-237.

ANEXO.

Gen	Polimorfismos	cDNA	Exon/intron	rs	Frecuencia descrita en heterocigosis	Frecuencia descrita para el alelo minoritario	Frecuencia descrita en la bibliografía	Situación
HCN4	L12L	g1030C>G	E1	rs201193660	ND	0,011	1% (Tu et al)	N-terminal
HCN4	G36E	g1101G>A	E1	rs143090627	ND		7,3-8,4% (Tu et al)	N-terminal
HCN4	S178S	g1528C>T	E1	rs111892410	ND			N-terminal
HCN4	R207R	g1615C>G	E1	rs138005226		0,001		N-terminal
HCN4	K248R	g1737A>G	E1	rs191744064	ND			N-terminal
HCN4	P294P	g25553C>G	E2	rs190347872	ND			S2
HCN4	P330P	g25661G>A	E2	rs146954200		0		linker S2-S3
HCN4	R332W	g25665C>T	E2	rs141185786		0		linker S2-S3
HCN4	L338L	g25685G>C	E2	rs147771899		0		linker S2-S3
HCN4	M343V	g25698A>G	E2	rs185719200	ND			S3
HCN4	I363V	g25758A>G	E2	rs144168042		0		linker S3-S4
HCN4	I363I	g25760C>T	E2	rs140902511		0		linker S3-S4
HCN4	D364N	g25761G>A	E2	rs151004999		0		linker S3-S4
HCN4	Y397Y	g25832C>T	E2	rs142643511		0		linker S4-S5
HCN4	S452S	g37119C>T	E3	rs148453034		0,003	1% (Tu et al)	linker S5-S6
HCN4	G462E	g39487G>A	E4	rs146714274		0		linker S5-S6

HCN4	G480R			rs121908411	ND	MUTACIÓN		linker S5-S6
HCN4	A485A	g39557G>A	E4	rs148875639	ND			linker S5-S6
HCN4	A485V			MUTACIÓN				linker S5-S6
HCN4	S490S	g39572C>T	E4	rs144298603		0		linker S5-S6
HCN4	Y506Y	g39620C>T	E4	rs139590882		0,004		S6
HCN4	H512H	g39638C>T	E4	rs146306966		0		S6
HCN4	L520L	g39660C>T	E4	rs12909882		0,132	0,0501 5,2% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4		c1631delC		MUTACIÓN				C-Terminal
HCN4	P545P	g43865C>T	E5	rs140015730		0		C-Terminal
HCN4	R550C	g43878C>T	E5	rs150691273		0		C-Terminal
HCN4	I551I	g43883C>A	E5	rs141966309		0,004		C-Terminal
HCN4	H552G	g43886C>T	E5	rs148142070		0,001		C-Terminal
HCN4	D553N			MUTACIÓN				C-Terminal
HCN4	Y555Y	g43895C>T	E5	rs147075615		0		C-Terminal
HCN4	G561G	g43913C>A	E5	rs62641690		0,024	70163	C-Terminal
HCN4	S568T	G>C		rs138714806		0,002		C-Terminal
HCN4	L573X			MUTACIÓN				C-Terminal
HCN4	F613F	g44171C>T	E6	rs117731813		0,002	0,025	C-Terminal

HCN4	IVS6+3G>T	g44313G>T, c1978+3G>T	I6	rs113112855	nd				intrón
HCN4	S672R			rs104894488	ND		MUTACIÓN		C-Terminal
HCN4	A675A	g45058C>T	E7	rs149033101		0			C-Terminal
HCN4	D676N	g45059G>A	E7	rs145134839		0			C-Terminal
HCN4	F703F	g45142C>T	E7	rs150378994		0,002			C-Terminal
HCN4	H727H	g45353C>T	E8	rs140354126		0,002			C-Terminal
HCN4	Q737R	g45382A>G	E8	rs146732972		0,002			C-Terminal
HCN4	A756T	g45438G>A	E8	rs143339036		0,001			C-Terminal
HCN4	V759I	g45447G>A	E8	rs62641689		0,003		2,1-0,3% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4	T770T	g45482G>A	E8	rs146809501		0			C-Terminal
HCN4	P771P	g45485C>T	E8	rs142298104		0			C-Terminal
HCN4	P776T	g45498C>A	E8	rs148714049		0			C-Terminal
HCN4	R800C	g45570C>T	E8	rs181894662	ND				C-Terminal
HCN4	Q821R	g45634A>G	E8	rs144206811		0,001			C-Terminal
HCN4	S831S	g45665C>A	E8	rs149640972		0,001			C-Terminal
HCN4	L832L	g45668G>T	E8	rs139394937		0,001			C-Terminal
HCN4	P852P	g45728G>A	E8	rs117819825		0,076		0,0135 9,6% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4	G864	A/TT/GA	E8	rs71442382		0,5			C-Terminal

HCN4	A867A	g45773C>A	E8	rs143188160	0,006		C-Terminal
HCN4	P868P	g45776C>T	E8	rs138773305	0,001		C-Terminal
HCN4	P883R	g45820C>G	E8	rs148398509	ND		C-Terminal
HCN4	P890S	g45840C>T	E8	rs184801511	ND		C-Terminal
HCN4	S891S	g45845G>A	E8	rs191092709	ND		C-Terminal
HCN4	A938	g45984G	E8	rs35620549	ND		C-Terminal
HCN4	A944V	g46003C>T	E8	rs144450232	ND		C-Terminal
HCN4	G973G		E8			1% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4	G973R		E8			1% (Tu et al-Mutación)	C-Terminal
HCN4	T993T	g46151G>A	E8	rs75307879	0,112	0,0258	C-Terminal
HCN4	P1001H	g46174C>A	E8	rs12591469	ND		C-Terminal
HCN4	S1011S	g46205T>G	E8	rs186728422	ND		C-Terminal
HCN4	P1016P		E8			1,1% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4	R1044W		E8			1-2,1% (Tu et al)	C-Terminal
HCN4	V1065V	g46367C>G	E8	rs4493011	ND		C-Terminal
HCN4	D1096D	g46460C>T	E8	rs116042117	0,05	0,0339	C-Terminal
HCN4	M1113V	g46509A>G	E8	rs142735148	ND		C-Terminal
HCN4	P1117L	g46522C>T	E8	rs140402087	ND		C-Terminal

HCN4	A1122fs	g46536delG	E8	rs35241186	ND				C-Terminal
HCN4	R1154Q	g46633G>A	E8	rs145862018		0,001			C-Terminal
HCN4	G1117E	g46702G>A	E8	rs141662311		0,001			C-Terminal
HCN4	P1194L	g46753C>T	E8	rs147982868		0,001			C-Terminal
HCN4	V1195L	g46755G>T	E8	rs143431889		0,001			C-Terminal
HCN4	R1196H	g46759G>A	E8	rs147181577		0,002			C-Terminal
HCN4	L1199Q	g46768T>A	E8	rs146751122		0,001			C-Terminal
HCN4	P1200P	g46772A>G	E8	rs529004		0,264	0,1479	46,9% (Tu et al)	C-Terminal

CYP3A4*1B	g99382096C>T			rs2740574		0,289	0,201		INTRON
CYP3A4*1G				rs2242480		0,335	0,277		
CYP3A4*22			i6	rs35599367		0,041	0,021		

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado de una u otra forma en la realización de este trabajo. En primer lugar a mi tutora, la Dra. Lucía Núñez Fernández por brindarme su apoyo y por atender siempre todas mis dudas.

Especialmente al Dr. Manuel Hermida y la Dra. Natalia Suárez por su ayuda y apoyo incondicional así como por su inagotable paciencia. A Isa y a Marta por las risas acompañadas del café de media mañana.

A mis profesores tanto de la carrera, como del máster; por los conocimientos que he adquirido a lo largo de los mismos y que me han aportado todas las nociones necesarias para llegar a este punto.

A mis padres, por confiar en mí y apoyarme con cada decisión que he tomado y en definitiva por haber hecho de mi lo que soy.

A todos mis amigos, en especial a Bibi, Valentina y Alba por estar siempre dispuestas a ayudarme, escucharme y darme ánimos.

A mis Biologuillos Deluxe, amigos y compañeros de batalla con los que he compartido mil y una historias y con los que sé que puedo contar siempre porque, como yo, están intentando buscar un hueco para dedicarse a lo que más les gusta, cada uno a su manera.

A todos vosotros, GRACIAS.