



POLIMORFISMOS GENÉTICOS CYP1A2*1C, CYP1A2*1F Y CYP1A2*1D EN PACIENTES CON
ESQUIZOFRENIA DEL HOSPITAL DEL SALVADOR DE VALPARAÍSO

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

NICOLÁS MARIO IGNACIO AYALA PARADA

Director de Tesis
Q.F. Caroline Weinstein

Codirector de Tesis
Q.F. Yanneth Moya

2017

Resumen.

Los polimorfismos genéticos para la isoenzima CYP1A2 (alelos CYP2A1*1C, CYP2A1*1F y CYP2A1*1D) tienen demostrada implicancia clínica sobre la farmacocinética de algunos fármacos, incluidos algunos de uso habitual en psiquiatría. Por esto, cobra importancia la identificación de dichos polimorfismos en pacientes, especialmente aquellos con diagnóstico de esquizofrenia refractaria. Para lograr este objetivo se contó con la contribución de 88 pacientes diagnosticados con esquizofrenia refractaria atendidos en el Hospital del Salvador de Valparaíso que fueron genotipificados en el gen CYP1A2 para los polimorfismos -3860G>A (alelo CYP1A2*1C), -2464>delT (CYP1A2*1D) y -163C>A (CYP1A2*1F), mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa acoplado a análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Las frecuencias alélicas y de genotipos estuvieron en equilibrio ($p \geq 0,05$), manifestando frecuencias similares a las encontradas en poblaciones nigeriana y mexicana para *1C ($A=0,630$), japonesa y peruana para *1D ($delT=0,369$); y caucásicas para *1F ($A=0,716$). Además, se validaron las técnicas para diagnóstico de CYP1A2 variante *1C y *1F. La determinación del polimorfismo *1D se logró estandarizar, pero requiere de métodos de secuenciación más específicos para su validación.

Así mismo se logró establecer las posibles frecuencias fenotípicas correspondientes, con una presencia de 0,374 de metabolizadores ultrarrápidos ante sustancias inductoras del CYP1A2. En conclusión, el uso de los polimorfismos analizados constituye una herramienta de utilidad clínica para clasificar a los pacientes y establecer *a priori* el riesgo de presentar una respuesta variable, que se traduce en un tratamiento inefectivo a bajas dosis para estos pacientes.

Abstract.

CYP1A2*1C, CYP1A2*1D and CYP1A2*1F genetic polymorphisms in schizophrenic patients attended in Hospital del Salvador at Valparaíso.

Genetics polymorphisms for isoenzyme CYP1A2 (alleles CYP2A1*1C, CYP2A1*1F y CYP2A1*1D) have demonstrated a clinical relevance over the pharmacokinetics of some drugs, included usual drugs used in psychiatry. Thus, the identification of such polymorphisms in patients is meaningful, particularly those with diagnosis of refractory schizophrenia. In order to accomplish this, 88 patients from Hospital del Salvador from Valparaíso diagnosed with refractory schizophrenia were available and were genotyped for the gene CYP1A2 in search for the polymorphisms -3860G>A (allele CYP1A2*1C), -2464>delT (CYP1A2*1D) and -163C>A (CYP1A2*1F), using the method of polymerase chain reaction coupled to restriction fragment length polymorphism analysis. Allelic and genotype frequencies were in equilibrium ($p \geq 0.05$), showing similar frequencies to those found in nigerian and mexican for *1C ($A=0.630$), japanese and peruvian for *1D ($\text{delT}=0.369$); and caucasics populations for *1F ($A=0.716$). In addition, the techniques were validated for diagnosis of the variants *1C y *1F of CYP1A2 gene. The *1D polymorphism determination was standardized, but the application of more specific methods are required for validation.

Also, the possible frequencies of the corresponding phenotypes were determined, with a presence of 0,374 of the individuals classified as ultra-rapid metabolizers when exposed to inducing substances. In conclusion, the use of the analyzed polymorphisms is a valuable tool of clinical usefulness for the classification of patients and for establishing *a priori* the risk of showing a variable response to drugs, that could finally translate in its lack of efficacy of the at low dose.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Farmacocinética clínica y variabilidad de respuesta a fármacos	1
1.2. Farmacogenética y Farmacogenómica.	4
1.3. Influencia del metabolismo: Citocromo P450 y variantes.	6
1.4. CYP1A2: caracterización e implicancia clínica.....	8
1.5. Trastorno Esquizofrénico: epidemiología, cuadro clínico y farmacoterapia.	13
1.6. Actualidad clínica y proyección del estudio.	17
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general:.....	22
3.2. Objetivos específicos:.....	22
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1. Características del estudio.	23
4.2. Pacientes.	23
4.3. Toma de muestra.	23
4.4. Procesamiento y almacenamiento de las muestras.	24
4.5. Validación de las técnicas de biología molecular.....	24
4.5.1. Materiales y Reactivos.	24
4.5.2. Extracción y purificación de ADN genómico.	26
4.5.3. Detección del gen CYP1A2 y sus variantes.	28
4.5.3.1. Detección de la variante CYP1A2*1C (-3860G>A).	26
4.5.3.2. Detección de la variante CYP1A2*1D (-2464T>delT).	28
4.5.3.3. Detección de la variante CYP1A2*1F (-163C>A).	30
4.5.4. Validación de la metodología.....	34

4.4.5.1. Selectividad.	32
4.4.5.2. Límite de Detección.	32
5.RESULTADOS	35
5.1. Calidad del ADN genómico extraído.	35
5.2. Detección de la variante CYP1A2*1C (rs2069514, -3860G>A).	36
5.2.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1C.....	37
5.3. Detección de la variante CYP1A2*1D (rs35694136, -2464T>delT).....	39
5.3.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1D.	40
5.4. Detección de la variante CYP1A2*1F (rs762551, -163C>A).	42
5.4.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1F.	43
6. DISCUSIÓN.....	47
6.1. Procedimiento de análisis por biología molecular.....	48
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	54
9. ANEXOS	60

1. INTRODUCCION

Desde el inicio de la farmacoterapia, ésta siempre ha tenido por objetivo la mejora o supresión de un proceso fisiopatológico no deseado en un individuo específico. Para ello, se basa en conceptos farmacológicos y una fuerte base científica manejada principalmente desde los aspectos empíricos de los fármacos a utilizar. Con el avanzar de la sociedad y la ciencia, ha sido posible multidisciplinar esta ciencia y asociarla a un sistema racional que permite definir lógicamente aspectos farmacocinéticos, farmacodinámicos, farmacología terapéutica y clínica, toxicología, considerando aspectos tanto de los medicamentos como de las enfermedades y los pacientes como un sistema de alta complejidad. De esta manera se ha logrado analizar las acciones y efectos en cada nivel biológico producto de la administración de una droga, generando un sistema complejo de respuesta asociado a dicho estímulo capaz de integrar horizontal y verticalmente los distintos niveles biológicos (Figura 1.1.). Es en este punto que con el descubrimiento, estudio y comprensión del ácido desoxirribonucleico (ADN) humano y procesos asociados, nace como nueva disciplina la farmacogenética y farmacogenómica, permitiendo completar los vacíos científicos y generar una perspectiva más completa y precisa de la farmacología y su aplicación clínica. Por otra parte se considera que la respuesta farmacológica es el resultado de la acción de diversos factores externos (psicológicos, sociales y ambientales) e internos asociados al paciente (genéticos y demográficos), que al integrarse determinan una farmacocinética y farmacodinamia específica que establece la interacción completa entre fármaco-enfermedad-paciente. De estos factores, el genético es el único aspecto inmutable durante todo el transcurso de la vida del paciente, teniendo estrecha relación en los aspectos tales como metabolismo enzimático de drogas, transportadores de membrana, dianas proteicas de drogas, entre otras. (Ingelman-Sundberg, Sim, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007)

1.1. Farmacocinética clínica y variabilidad de respuesta a fármacos.

Para el desempeño práctico de la disciplina y sobre la base aspectos de la población por sobre de los individuales, es que la farmacoterapia adopta la dosificación estándar de los medicamentos como concepto fundamental. Si bien esta práctica no se ajusta a necesidades individuales ni considera aspectos que aseguren el éxito terapéutico para una etnia o población particular, permite el mejor y más eficiente desarrollo costo-beneficio para la producción masiva de medicamentos, y de igual manera facilita el ejercicio de la práctica clínica, existiendo por concepto básico una idea reduccionista de la integración droga, enfermedad y paciente. El costo actual del desarrollo, ensayo clínico y aprobación de una sola molécula rodea el billón de dólares (Turner, Park, & Pirmohamed, 2015). Sin embargo, los resultados clínicos obtenidos por una terapia definida en dosis fija fallan y no siempre se correlacionan con una mejoría en la salud de los pacientes. En algunos de

los casos es posible apreciar una disminución o ausencia de respuesta terapéutica, así como también reacciones adversas asociadas a comportamientos dosis dependientes o eventualmente manifestar toxicidad, estimándose que solo el 50-75% de los procesos patológicos son exitosamente tratados con tratamientos de primera línea (Turner et al., 2015). Se genera de esta manera un aumento en los costos y estadías de hospitalización, pérdida de ingresos y producción familiar, generando discapacidad y costos de salud importantes para el país (Sánchez et al , 2014).

Es posible identificar distintas variables implicadas en la obtención de una respuesta farmacológica deseada. Para ello es esencial evaluar aspectos farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y excreción de las drogas, en conjunto conocido por disposición de drogas) presentes en un individuo en particular, tomando en consideración factores genéticos, ambientales, fisiológicos, iatrogénicos (interacciones entre fármacos) y patológicos. Dentro de la farmacocinética, destaca la farmacocinética clínica, la cual tiene por objetivo alcanzar y mantener concentraciones plasmáticas para generar una respuesta terapéutica sin manifestar toxicidad al tratamiento (Armijo, 2014). En esta área se definen distintas causas vinculadas a la variabilidad de respuesta a un fármaco, entre ellas existen las que son dependientes del individuo (adherencia, edad, genética, fisiopatología, sexo, nutrición, entre otros) y las dependientes del fármaco (formulación, vía de administración, interacciones, farmacocinética y farmacodinamia) (Calvo, García, Martínez, & Fernández, 2002). Dentro de estas, los procesos asociados a proteínas como metabolismo y transporte, destacan como uno de los factores independientes con menor grado de manejo clínico y que al mismo tiempo está estrechamente relacionado con factores genéticos, ambientales y características como edad, género y patologías asociadas (de Leon, 2009). Estos factores están afectando directamente sobre las diferencias interindividuales de respuesta a fármacos, especialmente sobre parámetros farmacocinéticos de las drogas, tales como tiempo de vida media ($t_{1/2}$), concentración máxima ($C_{máx}$), tiempo máximo ($t_{máx}$), tiempo de eficacia terapéutica, concentración plasmática, entre otros (de Leon, 2009; Mitchell, 2001).

En sus inicios, Sir Archibald Garrod (1858-1936) generó el concepto de “individualidad química” como aquella que buscaba explicar la presencia de un componente familiar en la respuesta adversa de medicamentos, al vincular estas con una alteración en las vías metabólicas de biotransformación de fármacos (Roden & George, 2002). Acuñándolo por primera vez en su libro “Errores congénitos del metabolismo” (“*The Inborn Errors of Metabolism*”, 1908) (Meyer, 2004). Este conocimiento fue reforzado en 1956, con la observación y asociación de alta tasa de hemólisis en pacientes con tratamiento de fármacos antimaláricos en individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Beutler, Dern, & Alving, 1955), y así, en diversos estudios durante el resto de siglo. Con los años ha sido posible asociar factores genéticos a aspectos de variabilidad de respuesta a fármacos, forjando así las ideas del fenotipo, y consiguientemente, luego del descubrimiento del ADN y el

desarrollo de la biología molecular y sus técnicas, que se abre camino para el inicio de la farmacogenética y farmacogenómica.

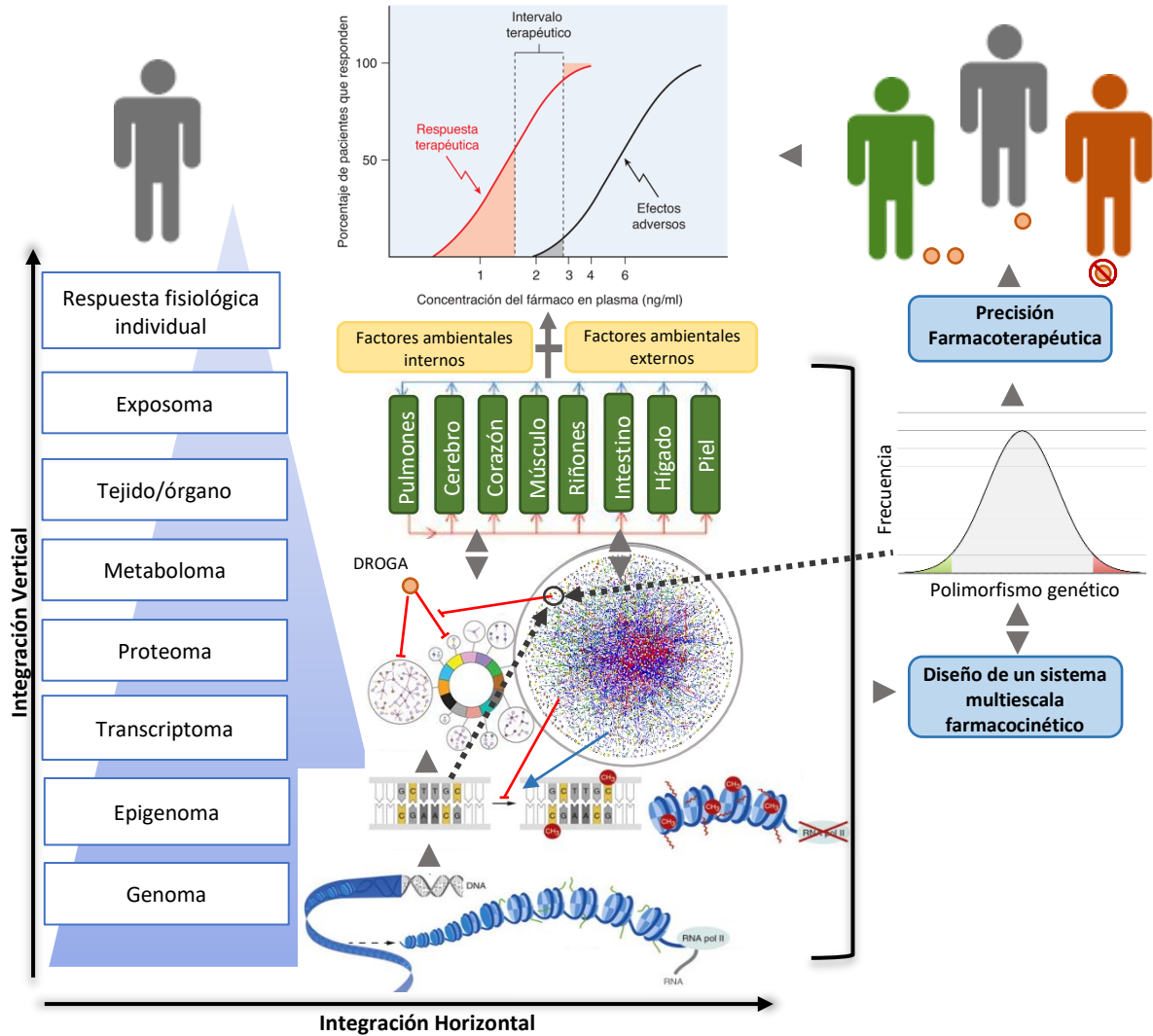


Figura 1.1. Integración de los niveles biológicos e implicancia en la Farmacología Clínica. **Genoma:** constituye la totalidad de la información genética propia de un organismo. **Epigenoma:** conjunto de marcas epigenéticas (RNA no codificante, metilación de bases nitrogenadas, acetilación de histonas, entre otros). **Transcriptoma:** colección de todas las lecturas genéticas, o de todos los ARN presentes en una célula. **Proteoma:** conjunto dinámico y completo de proteínas expresadas por un organismo o una célula. **Metaboloma:** totalidad de metabolitos, intermediarios metabólicos, hormonas y metabolitos secundarios propios de un organismo. **Tejido/órgano:** la agrupación de una misma línea celular define a un tejido, y la suma de distintas líneas celulares integradas e interrelacionadas definen a un órgano. **Exposoma:** factores ambientales externos e internos que es capaz de alterar los procesos propios de un organismo. **Respuesta fisiológica individual:** respuesta biológica resultante de la interacción de los niveles biológicos inferiores y constituye la suma de distintos procesos. (NPG, 2014; Pinazo-Durán, 2012) Fuente: Adaptación y diseño propio desde Blumenthal & Garrison, 2012; Mukherjee, Twyman, & Vilcinskis, 2015; Stelzl et al., 2005; Turner et al., 2015.

1.2. Farmacogenética y Farmacogenómica.

Los primeros esbozos de la farmacogenética buscaban identificar y explicar fenómenos que constaban de particularidades poco comunes en individuos específicos y que, además, presentaban un factor familiar importante. Es así como mediante el análisis de actividades enzimáticas, metabolitos de drogas y respuesta a fármacos es que permite el desarrollo de esta nueva disciplina durante mediados del siglo XX (Meyer, 2004). De esta manera, y mediante la integración con la farmacogenética es que se logra comprender la razón de la frecuencia y severidad de algunas reacciones adversas, vislumbrar la existencia de factores enzimáticos genéticamente dependientes que determinan susceptibilidad para ciertas patologías, así como también favorecen episodios de toxicidad ante dosis consideradas como terapéuticas e inocuas para la mayoría de los individuos.

Es para el año 1959, que Friedrich Vogel emplea por primera vez el concepto “farmacogenética”, dándole el reconocimiento de disciplina científica. De esta manera adquiere los márgenes que la definen como ciencia que estudia las variantes genéticas en una población y su efecto en la farmacocinética de un fármaco en particular. Pero con el avanzar de las décadas, y el progreso de la ciencia aplicada principalmente en biología molecular y bioquímica, fue necesario emplear un término más global, siendo este el de farmacogenómica. Este nuevo término asocia el uso de la información completa del genoma para predecir la disposición y acción de un fármaco (Roden & George, 2002). Siendo un concepto más completo que considera aspectos de la variabilidad genética de distintos factores, adicionales a los asociados al metabolismo de la droga, tales como al transporte de entrada celular, mecanismos de eflujo celular, regulación transcripcional de las enzimas metabólicas y de transporte, las dianas moleculares (enzimas, intermediarios, proteínas de transporte o estructurales) y su propia regulación transcripcional, y finalmente, considerando la variabilidad biológica del sitio donde se genera la interacción droga-diana (Hoffmeyer et al., 2000; Roden & George, 2002).

Para considerar una variabilidad genética como polimorfismo genético, en vez de una simple mutación, se requiere que se exprese en al menos el 1% de una población geográficamente definida, siendo una variación estable en un locus determinado. De estos, los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, sigla en inglés *Single nucleotide polymorphism*) corresponden al 90-95% de todos los sitios de variabilidad presentes en el genoma, y solo corresponden a <1% de las 3,2 billones de pares de bases (pb) que comprenden el genoma haploide (Meyer, 2004). Se estima que existen alrededor de 3-10 millones de SNP, ocurriendo aproximadamente cada 300-3000pb si se comparara el genoma de dos individuos sin parentesco (Meyer, 2004; Roden & George, 2002; Sachidanandam et al., 2001). Como ya se explicó con anterioridad, esto genera una variabilidad de respuesta a fármacos asociada a una alteración de las proteínas involucradas tanto en la farmacocinética

como farmacodinamia de estas moléculas, teniendo como final práctico la individualización terapéutica de los tratamientos farmacológicos, considerando selección y dosificación óptimas; y de igual manera determinar pautas terapéuticas acorde a la prevalencia de ciertos SNP en una población dada (Meyer, 2004). En la práctica clínica la utilidad de los SNP se vincula a frecuencias que sean >10% de la población o que, siendo SNP raros, generen un fenotipo muy marcado, desencadenando respuestas clínicas extremas de toxicidad o ineficacia (Roden & George, 2002). La farmacogenética se enfoca especialmente en los SNP como polimorfismos genéticos primordiales, principalmente por lo común de su presencia en la población y por tener una técnica de análisis de menor complejidad que para el resto de polimorfismos (inserciones o deleciones de pequeña magnitud, elementos polimórficos repetitivos, variaciones microsatelitales, entre otros) (Meyer, 2004). Todo esto destaca al momento de utilizar en tratamientos farmacológicos con estrecho margen terapéutico, de alta liposolubilidad y extensa metabolización hepática, que así mismo se caracterizan por marcadas y graves reacciones adversas, que incluso pueden ser letales.

Para la consideración de la importancia de variantes genéticas involucradas en la variabilidad farmacológica de una población como la chilena, es que es necesario comprender primero las características demográficas de su genoma, definiendo rasgos hereditarios asociados a la ascendencia étnica de los individuos. Esto permite dar márgenes a un estudio farmacogenético, guiándole en la búsqueda de los SNP con mayor presencia en la población. En el caso de Chile, el impacto génico de las distintas culturas predominantes en el país está definido hasta el año 2014 (Tabla 1.1.). Por lo que se entiende que las principales etnias que influyen el genoma en la región de Valparaíso, Chile, corresponden a la americana y la europea principalmente, con un mínimo de genoma africano.

Tabla 1.1. Índices de mezcla americana, europea y africana de la población mixta de Chile.

Polimorfismos SNP	Porcentaje promedio (%)			
	País	Regiones		
		Chile (n=923)	Coquimbo (n=16)	Valparaíso (n=53)
americano	44,10 ± 3,96	52,09 ± 10,66	42,10 ± 13,33	40,55 ± 15,02
europeo	51,85 ± 5,44	44,93 ± 12,27	53,64 ± 15,69	54,91 ± 15,69
africano	3,81 ± 0,45	2,98 ± 3,22	4,26 ± 5,62	4,53 ± 7,32

SNP: polimorfismo de nucleótido simple (sigla en inglés de *single nucleotide polymorphism*); **americano**: SNPs de pueblos nativos de América; **europeo**: SNPs de pueblos del sur de Europa, preferentemente españoles; **africano**: SNPs de África occidental subsahariana, preferentemente Yorubas.

Fuente: Adaptación de Fuentes et al., 2014.

1.3. Influencia del metabolismo: Citocromo P450 y variantes.

El metabolismo de fármacos siempre ha sido un parámetro esencial al evaluar la variabilidad de respuesta, principalmente las enzimas del sistema del citocromo P450 (CYP450). Estas constituyen una familia enzimática con una de las mayores actividades catalíticas en biotransformación por oxidación sobre moléculas lipofílicas xenobióticas, incluyendo dentro de estas a drogas utilizadas en la práctica clínica. La actividad de estas enzimas equivale al 80% de toda la actividad de metabolismo de fase I del organismo (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Estas enzimas se expresan a nivel del retículo endoplasmático liso en hepatocitos y en varios tejidos extrahepáticos, siendo responsables del metabolismo de fase I de nutrientes, toxinas, drogas y sustancias endógenas, tales como esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, y prostaglandinas, entre otros (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zanger & Schwab, 2013). Se encuentran codificadas en el genoma humano por 57 genes distintos, los que se agrupan en 18 familias y 44 subfamilias de acuerdo a la similitud de sus secuencias génicas (Zanger & Schwab, 2013). De todas éstas, sólo la porción correspondiente a las familias de CYP450 1, 2 y 3, son las encargadas del metabolismo de fármacos y xenobióticos. Si bien los distintos citocromos comparten parte del espectro de sustratos que metabolizan, las diferencias estructurales derivadas de la secuencia génica les otorgan afinidades distintas, e incluso amplían su especificidad a otras moléculas; esto da origen a que ciertas moléculas sean de metabolización exclusiva por un tipo de CYP450. Esta cualidad se traduce en una característica que influye en la farmacología clínica cuando dicho gen del citocromo esté sujeto a un polimorfismo genético o mutación que altere su actividad enzimática y genere variabilidad interindividual terapéutica (Spina & de Leon, 2015), así como también en una herramienta de utilidad para la determinación fenotípica de los pacientes.

Entre las isoenzimas de CYP450 que destacan por su implicancia metabólica sobre moléculas terapéuticas, se encuentran: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 (Spina & de Leon, 2015). Todas están sujetas a factores que influyen en su expresión y grado de función, este último se ve directamente alterado según el polimorfismo genético presente, ya sea delección, transversión, inserción o duplicación de secuencias en los genes codificantes para CYP450, así como cualquier SNP. Todos estos dan origen a diferentes variantes fenotípicas relacionadas al genotipo metabólico identificado en el paciente. Se ha señalado que incluso algunos polimorfismos alteran la selectividad de sustrato o la inducibilidad de ciertas vías metabólicas (Zanger & Schwab, 2013).

La manera más tangible de determinar la actividad de un citocromo es utilizando la selectividad de sustratos existentes en estos, mediante pruebas *in vivo*, que permiten determinar fenotipos mediante el uso de una molécula de sondaje. Para esto se utilizan sustancias cuyo metabolismo sea exclusivo por una de las isoformas

en estudio, y, a través de la relación de niveles de sustrato/metabolito en orina o plasma, se clasifica *a priori* la actividad metabólica de dicha enzima (Hiemke & Shams, 2013). De este estudio es posible determinar una clasificación fenotípica de farmacocinética que responde a los factores genéticos del individuo. Estas clasificaciones corresponden a metabolizadores lentos (ML) que se caracterizan por ser homocigotos o heterocigotos para alelos con pérdida de función (alelos truncados) o por delección génica de alguno de los alelos; metabolizadores extensivos (ME) refiere al fenotipo “normal” o salvaje, con mayor incidencia en la población; metabolizadores intermedios (MI) definido para aquellos individuos que poseen tan solo un alelo salvaje y uno funcionalmente deficiente, o ambos alelos con algún grado menor de deficiencia; y metabolizadores ultrarrápidos (MU), que se originan por la ganancia de variantes genéticas, es decir por la existencia de más alelos codificantes para el mismo CYP450 o por polimorfismos que incrementen significativamente la afinidad de la enzima por el sustrato (Figura 1.2.) (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zanger & Schwab, 2013).

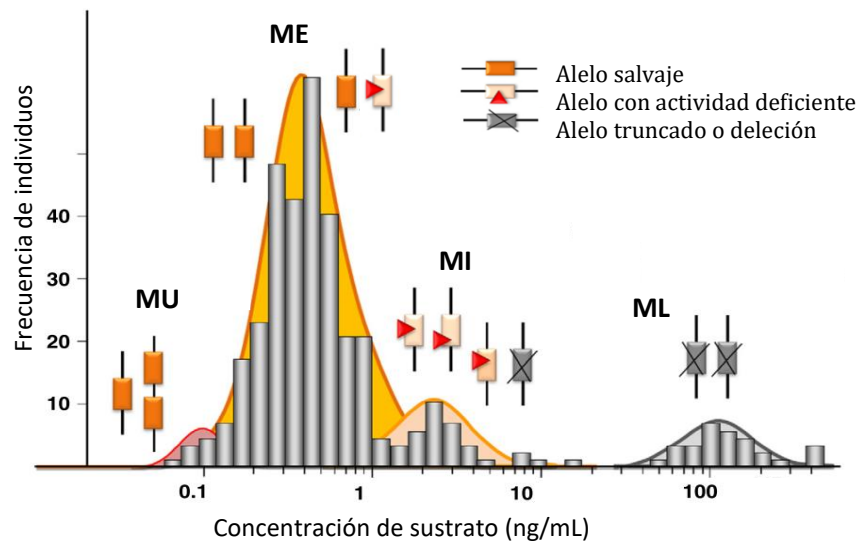


Figura 1.2. Gráfico de frecuencia de fenotipos metabolizadores según concentración plasmática a tiempo de $C_{máx}$. MU: metabolizadores ultrarrápidos; ME: metabolizadores extensivos (salvajes); MI: metabolizadores intermedios; ML: metabolizadores lentos. Fuente: adaptación Zanger & Schwab, 2013.

1.4. CYP1A2: caracterización e implicancia clínica.

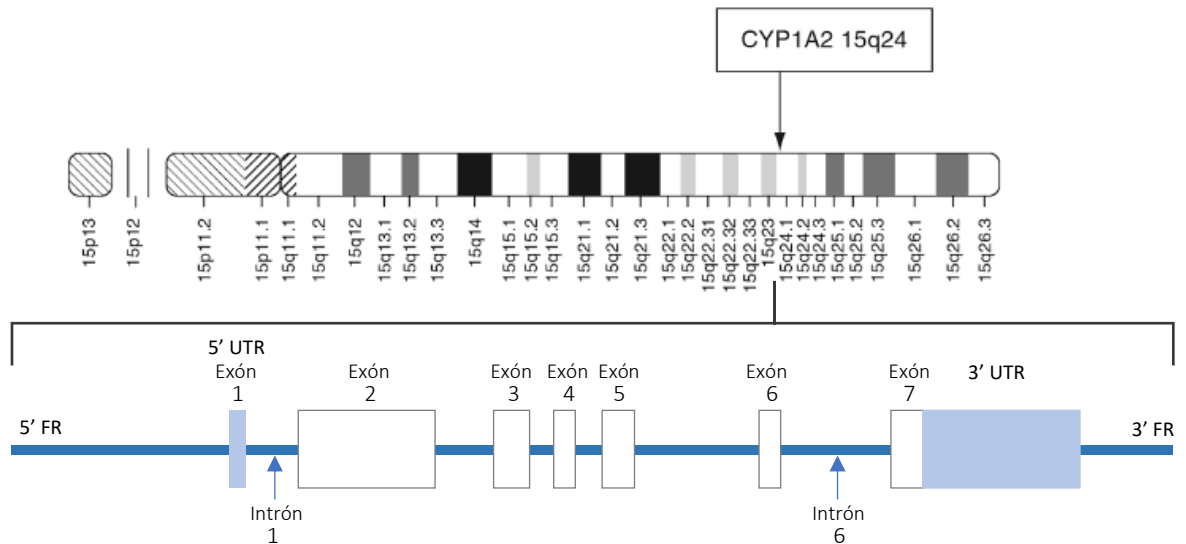


Figura 1.3. Cromosoma 15, locus y representación genética para la estructura del gen CYP1A2. FR: región límite (*frame región*); UTR: región no traducidas (*untranslated trailer*). Fuente: adaptación de Mrazek, 2010.

De todas las subfamilias de isoformas anteriormente descritas para CYP450, el CYP1A2 corresponde a una de particular importancia dado el espectro de sustratos que es capaz de oxidar. Esta isoforma tiene un tamaño de 7,8kb, se ubica en el cromosoma 15, locus 15q24.1, se conforma de siete exones y seis intrones, y cataliza del 4 al 16% de la carga enzimática total correspondiente a los CYP450s (Mrazek, 2010; Spina & de Leon, 2015; S.-F. Zhou, Yang, Zhou, Liu, & Chan, 2009) (Figura 1.3.). CYP1A2 metaboliza una amplia variedad de fármacos que incluyen analgésicos y antipiréticos, antipsicóticos, antidepresivos, antiinflamatorios, de tratamiento cardiovascular, tacrina, zolpidem, teofilina y cafeína, entre otros sustratos (Tabla 1.2.) (Zanger & Schwab, 2013). De todos estos, los que destacan por sus pautas posológicas, reacciones adversas e implicancia en su eficacia clínica, son los fármacos antidepresivos y antipsicóticos, por sus características farmacodinámicas, actividad a nivel de neurotransmisores del sistema nervioso central y su uso habitual en psiquiatría (Zhou, Liu, & Chowbay, 2009). De igual manera se ha establecido la implicancia de los receptores de hidrocarburos aromáticos (AhR) y sus ligandos como inductores de la expresión del gen CYP1A2. Adicionalmente, se ha descrito inducibilidad mediada por moléculas como omeprazol, fenobarbital, primaquina, e incluso por influencia del hábito tabáquico. Por otro lado, la inducibilidad de CYP1A2 se ve disminuida en estadios patológicos con incremento de Proteína C reactiva y durante episodios de colestasia. Finalmente, también existen inhibidores de la enzima, como la α -naftoflavona y fluvoxamina. Todas estas moléculas llevarían a alterar la actividad enzimática ante una prueba fenotípica, influenciando en el resultado y originando falsos resultados que no concordarían con resultados de pruebas genotípicas (Zanger & Schwab, 2013).

Tabla 1.2. Sustratos e interacciones asociadas a la isoenzima CYP1A2.

Fuente: adaptación de Martínez-Cue & Flórez, 2014; S. Zhou et al., 2009; S.-F. Zhou et al., 2009.

Isoenzima	Sustratos según porcentaje de metabolización	Moléculas inductoras	Moléculas inhibidoras
CYP1A2	<p><u>≥30%</u>: cafeína, clozapina, olanzapina, teofilina, tacrina, aminopirina, zolmitriptan, melatonina, propranolol, duloxetine, verapamilo, ripovacaína, estragol, hidrocarburos aromáticos policíclicos, micotoxinas, bilirrubina, estradiol, ácido araquidónico, etc.</p> <p><u>10-30%</u>: acetaminofeno, flutamida, lidocaina, paraxantina, propafenona, terbinafina, bortezomib, trazodona, R-warfarina, R-acenocumarol, imipramina, etc.</p> <p><u><10%</u>: fluvoxamina, zolpidem, ciclobenzaprina, naproxeno, cumarin, ondasetrón, haloperidol, guanabenz, rofecoxib, efavirenz, carvedilol, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, carbamazepina, albendazol, amiodarona, difenilhidramina, etc.</p>	<p>Fenitoína, fenobarbital, hidrocarburos aromáticos policíclicos, tabaco, omeprazol, rifampicina.</p>	<p>Cimetidina, ciprofloxacino, claritromicina, enoxacino, eritromicina, fluvoxamina, isoniazida, ketoconazol, omeprazol, paroxetina, quinolonas.</p>

Hasta el momento se han descrito 177 SNP para el gen CYP1A2, otorgándole así 21 variantes alélicas para el gen, determinados mediante clasificación numérica desde el *1 al *21. Entre estas, la variante CYP1A2*1, posee una subclasificación a la que se le asignan 21 letras, de la "A" a la "H", siguiendo en la "J" hasta la "N", y finalmente desde la "P" a la "W" (Sim, 2010; Spina & de Leon, 2015), cada uno con una serie de SNP propios. De todos éstos se reconoce al polimorfismo CYP1A2*1A como la variante salvaje para el gen, y es el utilizado como parámetro de comparación de actividad enzimática de CYP1A2 en estudios clínicos (Zanger & Schwab, 2013). De todos estos polimorfismos, las variantes *1G, *1H, *1L, *1M, *1N, *1P, *1Q, *1R, *1S, *1T, *1U, *1V y *1W, se presentan en muy bajas frecuencias para el gen CYP1A2 y no alteran la actividad o expresión de la enzima (Zhou et al., 2009). Además, sólo se reconocen ocho variantes que disminuyen la actividad y expresión de CYP1A2, correspondiente a *1K, *3, *4, *5, *8, *11, *15 y *16. Dos variantes que aumentan la expresión del gen por inducibilidad, *1D y *1F. Y aún, no queda del todo claro la actividad atribuible a la variante *1C, ya que en individuos descendientes de japoneses genera disminución de la expresión de CYP1A2 (Nakajima et al., 1999), mientras que aumenta la expresión en aquellos con ascendencia europea (Mrazek, 2010). Adicionalmente existen dos variantes que no alteran la expresión ni actividad del gen (*1A y *1B), de los que el CYP1A2*1A adicionalmente se le atribuyen características de disminuir la inducibilidad de la enzima

y al mismo tiempo es reconocido como la variante salvaje; y finalmente hasta el momento solo se han detectado dos variantes asociadas a la pérdida de función o que adoptan la denominación de genes truncados (*6 y *7) (Mrazek, 2010; Spina & de Leon, 2015; Zanger & Schwab, 2013; S.-F. Zhou et al., 2009).

De todos polimorfismos descritos anteriormente, destacan por su alta frecuencia e impacto clínico el -3860G>A (CYP1A2*1C, rs2069514), el -163C>A (CYP1A2*1F, rs762551) y el -2464T>delT (CYP1A2*1D, rs35694136), cuyos efectos sobre la actividad e inducibilidad del CYP1A2 se señalan en la Tabla 1.3. También es importante recalcar el escenario genómico presente en Chile, especialmente para la región de Valparaíso, el que vincula una carga génica del 53,6% procedente de Europa, un 42,1% de América y un 4,3% de África (Fuentes et al., 2014). Esto, de manera preliminar, permite otorgar una referencia asociada a las frecuencias esperables hallar para los genes de CYP450 en la población de estudio. En la Tabla 1.4. se señalan las frecuencias de los polimorfismos de mayor interés clínico según herencia de distintas poblaciones posiblemente presentes en el genoma chileno.

Tabla 1.3. Número de referencia para polimorfismos del gen CYP1A2, genotipos y fenotipo respectivo.

Nombre del alelo	Número de referencia SNPs (rs)	Polimorfismo (SNP)	Genotipo	Inducibilidad/Actividad ¹
*1A (salvaje)	n/a	n/a	salvaje	Normal
*1C	rs 2069514	-3860 G → A	G/G A/G A/A	Normal Normal Disminuida/Aumentada
*1D	rs 35694136	-2464 T → delT	T/T delT/T delT/delT	Normal Normal Aumentada
1F	rs 762551	-163 C → A	C/C C/A A/A	Disminuida Sin efecto Aumentada

¹Bageman, Ingvar, Rose, & Jernström, 2008; Kootstra-Ros, Smallegoor, & Van Der Weide, 2005; Pavanello et al., 2010; Sachse et al., 2003; Siok et al., 2010; S.-F. Zhou et al., 2009.

*Establecido como metabolizador ultrarrápido (MU), se ha descrito resistencia a farmacoterapia con clozapina en pacientes esquizofrénicos y fumadores (Eap, Bender, & Jaquenoud Sirot, 2004; Ozdemir, Kalow, & Okey, 2001). Fuente: diseño propio.

Tabla 1.4. Frecuencias alélicas según distintas poblaciones de Europa, América, África y Asia.

Población	Frecuencia alélica (%)					
	-3860 G>A		-2464 T>delT		-163 C>A	
Caucásicos	G	A	T	delT	C	A

Británicos (n=182)	98,90	1,10	93,41	6,59	26,92	73,08
Españoles (n=214)	99,07	0,93	95,79	4,21	35,98	64,02
Italianos (n=214)	97,66	2,34	89,72	10,28	37,85	62,15
Americanos						
Peruanos (n=170)	31,76	68,24	53,91	46,09	13,53	86,47
Mexicanos (n=128)	61,72	38,28	25,29	74,71	26,56	73,44
Africanos						
Nigeria (n=216)	67,59	32,41	48,15	51,85	45,83	54,17
Asiáticos						
Japoneses (n=208)	76,92	23,08	60,58	41,67	39,90	60,10

Fuente: fuente de datos del genoma humano (NCBI & NHGRI, 2010).

Al momento de integrar dichos polimorfismos con las clasificaciones fenotípicas descritas previamente (MU, ME, MI y ML), es que es posible señalar una falencia de la fenotipificación como tal, dado principalmente por las características de sus polimorfismos de incrementar, disminuir o manifestar resistencia a la inducibilidad de la transcripción y síntesis de la enzima, lo que da por resultado que, en el caso del gen CYP1A2, la fenotipificación no sea precisa al momento de declarar un perfil metabólico del paciente. Es en este punto que la genética apoya a la fenotipificación, permitiendo establecer a los pacientes MU definidos por genotipos del tipo *1D/*1D y *1F/*1F, en los que la predicción como MU solo es válida en el contexto de presencia de un inductor, de otro modo actuarían como ME (Eap et al., 2004; Kootstra-Ros et al., 2005; Ozdemir et al., 2001). Por otro lado, los ME propiamente tales están conformados por los individuos del genotipo *1A/*1F, *1A/*1D, *1A/*1C y el *1A/*1A, este último reconocido como salvaje y al que se le atribuye una resistencia a ser inducido por moléculas que por otro lado generan un incremento significativo de los genotipos *1D y *1F (Mrazek, 2010); los MI a aquellos pacientes con solo uno de sus alelos completamente funcional (*1A, *1C, *1D o *1F), mientras que el otro corresponde a un alelo con pérdida de función o deficiencia de la misma; y finalmente los ML como aquellos en que ambos alelos para el gen CYP1A2 corresponden a uno de los diez alelos asociados a la pérdida o reducción de actividad enzimática ya enunciados. Adicionalmente, al momento de establecer una importante descendencia europea en la genómica de la población chilena, es posible añadir el genotipo *1C/*1C como parte de los MU, lo cual incrementa las posibilidades como tal de que un individuo presente dicho fenotipo (Mrazek, 2010). Cabe señalar que no existen estudios que asocien la presencia integrada de haplotipos del tipo *1D/*1F, *1C/*1F y *1D/*1C con incrementos significativos del metabolismo por CYP1A2, la única concordancia existente señala que la presencia heterocigota aislada de dichos polimorfismos está asociado a un fenotipo de metabolizador extensivo. Es en base a esto que los genotipos heterocigotos para las variantes CYP1A2*1C, *1D y *1F son analizados como posibles ME. Todo lo señalado anteriormente se visualiza en resumen en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Haplotipos según polimorfismos en estudio y fenotipo metabólico asociado.

Haplotipos para CYP1A2	*1A	*1C	*1D	*1F
*1A	ME (salvaje)	ME	ME	ME
*1C	-	MU	ME	ME
*1D	-	-	MU	ME
*1F	-	-	-	MU

MU: metabolizadores ultrarrápidos; **ME**: metabolizadores extensivos

Fuente: diseño propio.

1.5. Trastorno Esquizofrénico: epidemiología, cuadro clínico y farmacoterapia.

La esquizofrenia se define como un complejo desorden psicótico de temple crónico y que es el resultado de procesos fisiopatológicos del neurodesarrollo y/o neurodegeneración de un individuo, que se manifiestan como desórdenes de la percepción, pensamientos y emociones. Todo esto conlleva a la alteración de las funciones esenciales de un individuo para establecer sus vivencias, singularidad y dominio sobre sí mismo, alterando de esta manera aspectos intrínsecos de su personalidad así como su capacidad de sociabilizar con su entorno y su interacción con su ambiente, haciéndolo un trastorno invalidante para muchos pacientes (Ministerio de Salud, 2009; Miyamoto et al, 2012; Patel et al 2014). Así mismo, es posible determinar factores de riesgo asociados a un aumento para padecer este trastorno, que incluyen susceptibilidad genética (antecedentes familiares), influencias ambientales (traumas en la infancia, minoría étnica, urbanidad y aislamiento social) y factores psicosociales (estrés por discriminación, adversidad económica) (Crismon, Argo, & Buckley, 2014; Ministerio de Salud, 2009).

A nivel mundial, la tasa de incidencia de esquizofrenia alcanza en promedio los 15,2 casos por cada cien mil habitantes al año (Bobes & González, 2000), siendo uno de los problemas de salud de alto costo, dado principalmente por su inicio temprano como el alto porcentaje de personas que mantendrían alguna de los síntomas en lo largo de su vida (Ministerio de Salud, 2009). Así mismo, se estima que el riesgo a desarrollar el trastorno esquizofrénico alguna vez en la vida es del 2,0%, existiendo una fuerte asociación entre migración, cercanía a las urbes y género masculino con un mayor riesgo a desarrollar esquizofrenia (McGrath et al., 2004). En Chile, la tasa de prevalencia alcanza las 1,4 a 4,6 personas por cada mil habitantes, siendo la tasa de incidencia de 12 casos nuevos por cada cien mil habitantes por año (Ministerio de Salud, 2009). Adicionalmente, en Chile existe una prevalencia de vida del 1,0% y de 6 meses de 0,3% (Vicente et al, 2002), siendo la esquizofrenia, junto a otras psicosis, responsable de una reducción del 1,87% del total de años de vida por muerte prematura y discapacidad en Chile (Ministerio de Salud, 2009).

Aún no está clara la etiología exacta de este trastorno, mas existe una importante asociación con un desbalance en la neurotransmisión de dopamina, serotonina y glutamato, a los que se asocian fuertemente los síntomas de la esquizofrenia. Adicionalmente existen otras teorías que implican a aspartato, glicina y ácido gamma-aminobutírico (GABA) como neurotransmisores regulatorios claves que generan indirectamente los síntomas de la esquizofrenia (Lavretsky, 2008). Sobre la base de esta complejidad de neurotransmisores involucrados es que se halla la fuente de los distintos cuadros sintomatológicos que presenta este desorden y que son clasificados como síntomas positivos, negativos y cognitivos (Tabla 1.6). Cada desorden se expresa con un patrón único de síntomas en un único individuo (Kim, Maneen, & Stahl, 2009; Lieberman, 1999). De

estos, el síntoma negativo puede ser primario a un desorden esquizofrénico o secundario a una psicosis concomitante, iatrogénico o factor ambiental (Patel et al., 2014). El principal neurotransmisor vinculado a este trastorno se asocia a dopamina y se ha establecido una actividad anormal de los receptores de dopamina, principalmente al receptor D2, y hasta la fecha se ha podido asociar a este receptor presente en cuatro vías encefálicas (nigrostriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular) y su alteración correlaciona clínicamente con los síntomas positivos en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (Schwartz & Javitch, 2013). Por otro lado, la implicancia de serotonina en los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia está dada por estudios clínicos, donde se asocia el ácido lisérgico dietilamida (LSD), agonista serotoninérgico, con la aparición de síntomas esquizofrénicos y se sustenta adicionalmente en la mejora clínica que presentan los pacientes al ser tratados con bloqueadores de receptores de serotonina. Del mismo modo sucedió con la implicancia del glutamato, donde la fenilciclidina y ketamina, ambos antagonistas de NMDA/glutamato inducen la aparición de síntomas similares a la esquizofrenias (Patel et al., 2014).

Tabla 1.6. Síntomas del trastorno esquizofrénico.

Síntomas de la esquizofrenia	
Positivos	Sintomatología expresiva: pensamientos delirantes, alucinaciones, trastornos del pensamiento, del lenguaje y conducta en varios grados de severidad.
Negativos	Sintomatología de deterioro: pobreza de expresión lingüística, retraimiento, insociabilidad, embotamiento y anhedonia.
Cognitivos	Sintomatología disfuncional: Alteraciones de la memoria, atención, competencias y velocidad de procesamiento.

Fuente: Martínez-Cue & Flórez, 2014; Patel et al., 2014.

En consecuencia a este escenario tan específico para cada paciente, es que el abordaje terapéutico difiere en cada uno de los casos diagnosticados (Martínez-Cue & Flórez, 2014). Esto se debe a que un trastorno esquizofrénico se conforma por distintos grados y clases de síntomas positivos, negativos y cognitivos, siendo cada uno de estos originados posiblemente por una fisiopatología distinta, y por ende se asocia a un tratamiento diferente (Miyamoto et al., 2012). Hasta la fecha la terapia para este trastorno se basa en dos pilares, el uso de fármacos neurolépticos y en terapia psicosocial. Los neurolépticos tienen por objetivo reducir recaídas y hospitalizaciones, mejorar los síntomas de la esquizofrenia y facilitar una claridad de pensamiento a los pacientes, para así relacionarse mejor con su medio, permitiendo su inclusión en programas psicosociales que vienen a apoyar la adaptación individual y familiar del paciente diagnosticado con esquizofrenia, así como las herramientas de cómo actuar y enfrentarse ante las exacerbaciones de los síntomas de la misma (Crismon et al., 2014; Martínez-Cue & Flórez, 2014; Patel et al., 2014).

La efectividad de los neurolépticos empleados para el tratamiento de la esquizofrenia se basa en su actividad moduladora de receptores dopaminérgicos de diversos subtipos. Esto debido al desbalance dopaminérgico en el cerebro que lleva a un exceso de actividad dopaminérgica de receptores D₂ en la vía mesolímbica y un déficit en la vía mesocortical (Martínez-Cue & Flórez, 2014). De esta manera, los neurolépticos de primera generación (NPG) o convencionales (haloperidol, clorpromazina, tioridazina, pimozida, flupentixol, sulpiride, periciazina, zuclopentixol, flufenazina y pipotiazina) presentan fuerte actividad antagonista de receptores D₂, consiguiendo una actividad antipsicótica con un 65-70% de los receptores bloqueados (Remington & Kapur, 1999). Aun así su principal inconveniente está dado porque solo basta bloquear sobre el 80% de los receptores D₂ para incrementar el riesgo de sufrir efectos extrapiramidales (EEP) (contracciones musculares severas e involuntarias, rigidez y temblores). Por otro lado, los neurolépticos de segunda generación (NSG) o atípicos (risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona, amisulpiride, aripripazol y clozapina) exhiben menor riesgo de generar EEP de dos maneras: primero, solo requieren un bloqueo de los receptores D₂ inferior al 60%, lo que aumenta los márgenes de seguridad; y segundo, presentan baja afinidad por el receptor D₂, con constantes de disociación altas, mayores que la de dopamina (Farde et al., 1992; Patel et al., 2014; Remington & Kapur, 1999). Otra cualidad de los neurolépticos de segunda generación es su alta afinidad por los receptores de serotonina 5-HT_{2A} principalmente (algunos también por los receptores 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇ y 5-HT_{1A}) confiriéndoles antagonismo serotoninérgico. La combinación de estos dos antagonismos permiten mejorar los síntomas negativos y disfunciones cognitivas en los pacientes, además de controlar las recaídas por síntomas positivos y hospitalizaciones (Patel et al., 2014).

El principio farmacológico del tratamiento con neurolépticos tanto de primera como de segunda generación, es la “titulación” de este por un periodo de dos semanas, hasta alcanzar una dosis cercana al límite inferior del rango terapéutico; si para la tercera semana no muestra señales de mejoría sintomatológica, se procede a incrementar la dosis por titulación hasta alcanzar concentraciones plasmáticas que correspondan al límite superior de su margen terapéutico, en un lapso de cuatro a ocho semanas; en este punto, si el paciente no manifiesta mejoría alguna, se procede a sustituir el medicamento, o en el caso de presentar mejoría pero con manifestación de reacciones adversas importantes (Tabla 1.7), se recomienda adicionar un medicamento capaz de controlarlas, o cambiar el neuroléptico según la gravedad de las reacciones. La sustitución de cualquier neuroléptico debe ser con una remoción gradual del previamente prescrito, acompañado de una adición gradual del nuevo fármaco (Ministerio de Salud, 2009). Es necesario tener presente que en el caso de los NPG, la tasa de respuesta favorable al tratamiento alcanza al 20% de los pacientes (Crismon et al., 2014; Patel et al., 2014), mientras que el resto manifiesta una respuesta parcial, no presenta mejoría alguna ante el tratamiento o desarrolla reacciones adversas inaceptables y de alto riesgo. Es importante señalar que los pacientes con trastorno esquizofrénico tienden a desarrollar un cuadro depresivo

en el 25% de los casos y que el 50% de los pacientes manifiesta en algún grado una tendencia suicida, logrando el 5% de estos dicho cometido (Miyamoto et al., 2012). Del mismo modo del 30% al 50% de los pacientes que poseen una prescripción para tratamiento antipsicótico, es considerado refractario a tratamiento principalmente por no ser capaz de remitir los síntomas negativos de la enfermedad (Ministerio de Salud, 2009; Miyamoto et al., 2012). En estos casos el único fármaco aprobado para su uso en esquizofrenia refractaria es a la clozapina, un NSG con una tasa del 30% de éxito terapéutico en un periodo de 6 semanas, mayor que la alcanzada al utilizar cualquier otro neuroléptico, lo que se beneficia aún más con la reducción clínica de síntomas depresivos y la reducción de la tendencia suicida en los pacientes en tratamiento (Miyamoto et al., 2012). La elección de monoterapia con clozapina debe ser rigurosamente monitorizada durante los primeros 6 meses de prescripción para evitar cualquier manifestación de agranulocitosis en el paciente; así mismo es necesario tener en cuenta la optimización de la terapia con la adición de un segundo fármaco (litio, anticonvulsivantes, antidepresivos o benzodiazepinas), de terapia electro convulsivante o de un neuroléptico adicional en caso de no responder satisfactoriamente a la terapia (Ministerio de Salud, 2009; Patel et al., 2014). El principal problema de las terapias con neurolépticos, es que si bien un paciente puede responder bien a una monoterapia con un neuroléptico, es común ver casos en que el paciente se vuelve progresivamente resistente a la farmacoterapia empleada, siendo necesario la constante monitorización y observación del cuadro clínico de los pacientes (J Lieberman, Jody, & Geisler, 1993).

Tabla 1.7. Reacciones adversas según generación de neurolépticos.

Reacciones adversas	NPG ¹	NSG ¹
Endocrino		
Hiperprolactinemia (conlleva disfunción sexual, disminución del libido, irregularidades menstruales o ginecomastia).	+++	+++/-
Ganancia de peso.	++/-	+++
Aumento de riesgo de DM.	s/r	+++
Cardiovasculares		
Hipotensión ortostática.	++	++
Prolongación intervalo QT.	++	++
Aumento del riesgo de muerte súbita	+	+
Hiperlipidemia	++/-	+++/-
SNC		
Distonía (alterado tono muscular, contracciones sostenidas o espasmódicas)	+++	+
Acatisia (incapacidad de mantenerse quieto y calmado, sin llegar a la angustia)	++	+
Riesgo de efectos extrapiramidales (pseudoparkinsonismo)	+++	+
Disquinesia tardía	+++	+/-
Sedación	++	++
Riesgo de convulsiones	+++/-	+++/-
Poiquilotermia (incapacidad de mantener una temperatura interna constante)	+++	++/-

Síndrome neuroléptico maligno	+	-
Efectos psiquiátricos (delirio, psicosis, confusión crónica y desorientación)	++	+
Efectos Misceláneos		
Glaucoma de ángulo estrecho y riesgo de cataratas	+++	+/-
Vacilación o retención urinaria e incontinencia urinaria	++	s/r
Disfunción sexual	++	++
Agranulocitosis	+ (CPM)	+ (CZP, OZP)
Reacción alérgica dermatológica	++	++
Fotosensibilidad	+	+
Sialorrea	s/r	++(CZP)

NPG: neuroléptico de primera generación; NSG: neuroléptico de segunda generación; DM: diabetes mellitus; SNC: sistema nervioso central; CPM: clorpromazina; CZP: clozapina; OZP: Olanzapina. (+++): muy frecuente; (++) : frecuente; (+): presente; (/ -): ausencia relativa en algunos exponentes de la generación; (-): ausencia de reacción adversa; (s/r): sin reporte.

¹ Martínez-Cue & Flórez, 2014; Ministerio de Salud, 2009; Miyamoto et al., 2012; Patel et al., 2014.

Fuente: diseño propio.

1.6. Actualidad clínica y proyección del estudio.

Actualmente la práctica clínica se limita a utilizar herramientas como el monitoreo de drogas terapéuticas (MDT), basado en el análisis de concentraciones plasmáticas para la determinación de la variabilidad farmacocinética interindividual de los pacientes en terapia (Mitchell, 2001). Esta herramienta permite realizar un ajuste de dosis basado en concentración plasmática obtenida, siempre y cuando, dicha relación posea una cinética de carácter lineal para dicha droga; y no busca clasificar al paciente fenotípicamente según actividad metabólica, sino que refleja la farmacocinética de un fármaco en específico en un contexto temporal y situacional determinados, no siendo posible extrapolar dichos resultados a cualquier punto de la vida de dicho paciente. Además, al tratar con fármacos de cinéticas no lineales, presentes en drogas que inducen o inhiben su propio metabolismo, se dificulta el ajuste de dosis para lograr una concentración terapéutica óptima, y con ello se ve reducida la utilidad del MDT en el marco clínico (Spina & de Leon, 2015).

Si bien la MDT puede integrarse a la fenotipificación, lo que significa un avance importante a nivel farmacológico, ya que se permiten prever respuestas teóricas ante la administración de distintas drogas a emplearse en una terapia en específico; pero no es del todo útil. Esto se debe a que la actividad metabólica de un citocromo no es equitativa para todos sus sustratos, y de la misma manera que un polimorfismo otorga una menor o mayor actividad enzimática, no necesariamente esto se verá reflejado en todos los sustratos de dicha enzima. Del mismo modo, tampoco toma en consideración interacciones de drogas o xenobióticos que alteren la expresión y actividad de las distintas isoformas del CYP450 ya presentes en el individuo, con lo que se llevaría a establecer fenotipos erróneos para los pacientes (Mitchell, 2001). Y por último, la actividad de un mismo citocromo varía durante los primeros años de vida, siendo significativo el tiempo en que algunos individuos tardan en alcanzar una actividad enzimática estable y plena, e incluso otros casos presentan un máximo de actividad para luego disminuir gradualmente (Hines, 2007; Tracy et al., 2016). Así mismo, la exposición a ciertas moléculas durante los primeros años de vida podrían incrementar la expresión y actividad del citocromo de manera sistemática durante la adultez del individuo, como se ha demostrado en modelos animales (Peng et al., 2012).

Es por esto que la genotipificación adquiere importancia por su valor como herramienta complementaria en la identificación de pacientes más susceptibles a presentar problemas de toxicidad, reacciones adversas inesperadas o falta de eficacia. De este modo se podrán identificar según su grado metabólico, con las implicancias clínicas, farmacoterapéuticas y farmacocinéticas que ello implica. Si bien aún se recomienda su uso integrado a estudios de fenotipificación y MDT, la implementación por sí sola permitiría establecer de manera certera patrones metabólicos específicos para cada paciente, tomando en consideración toda la batería de polimorfismos prevalentes en la población y de impacto clínico significativo para abordar de mejor manera los tratamientos específicos.

Esta tesis de investigación es parte del Proyecto: “Identificación de biomarcadores asociados a síntomas psicóticos refractarios en personas enfermas de esquizofrenia” dirigido por el Dr. Álvaro Cavieres F. y sirve como una primera instancia para el desarrollo de herramientas de genotipificación aplicables al ámbito clínico. Este proyecto está asociado al Hospital del Salvador de Valparaíso, hospital público especializado en salud mental, perteneciente a la red de Servicio de Salud Valparaíso-San Antonio (SSVSA), que brinda atención integral a personas con trastornos psiquiátricos y problemas de adicción a drogas y alcohol en la Macrored de Salud, Región de Valparaíso. Adicionalmente este centro funciona como campo para la docencia e investigación en el área.

Uno de los grupos de pacientes en los que en función de la genotipificación habrá un mayor impacto por su valor complementario sobre la terapia de los mismos, corresponde a los pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria a tratamiento, dado principalmente por sus reducidas opciones terapéuticas a nivel de servicio público de salud, siendo la alternativa más empleada para estos casos el neuroléptico atípico clozapina, cuya variabilidad de respuesta interindividual requiere de ajustes de dosis considerables de un paciente a otro considerando la respuesta clínica y presentación de reacciones adversas. Además, la dependencia de esta variabilidad se encuentra estrechamente ligada a los polimorfismos encontrados en el CYP1A2 (CYP1A2 *1C, *1D y *1F).

Cabe resaltar la importancia de las características demográficas del genoma de la población en estudio, asociadas a la presencia de variantes genéticas involucradas en la variabilidad farmacológica planteada. En el caso de Chile, el impacto génico de las distintas etnias que conforman el escenario genómico presente en Chile, específicamente para la región de Valparaíso, en donde se asocia una carga génica del 53,6% procedente de Europa caucásica, un 42,1% a nativos americanos y un 4,3% del África subsahariana (Fuentes et al., 2014). Dicha información permite dar una idea de la influencia de dicha contribución génica con la frecuencia de los polimorfismos en estudio y permite otorgar una referencia asociada a las frecuencias esperables hallar para los genes de CYP1A2 en la población de estudio (Tabla 1.4).

Esta investigación pretende contribuir a mejorar la calidad de vida en pacientes como consecuencia del empleo de herramientas de análisis clínico que permitan asegurar un correcto manejo farmacológico del individuo. Lo anterior, logrado mediante el aprovechamiento de las capacidades del químico farmacéutico, y sus conocimientos tanto farmacogenéticos como farmacológicos para el desarrollo de nuevas perspectivas para el análisis crítico de protocolos terapéuticos. Todo esto para alcanzar el mejor grado de seguridad y

eficacia en las terapias farmacológicas empleadas, proyectando así una mejora en calidad de vida de los pacientes y del tratamiento de sus patologías.

2. HIPÓTESIS

La determinación de polimorfismos genéticos para la isoenzima CYP1A2 (CYP2A1*1C, CYP2A1*1F y CYP2A1*1D) en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria de la Región de Valparaíso, atendidos en el Hospital del Salvador de Valparaíso; contribuirá a su identificación y clasificación según genotipo metabólico para fármacos de uso habitual en psiquiatría.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Definir los polimorfismos genéticos CYP1A2*1C, CYP1A2*1F y CYP1A2*1D en pacientes con esquizofrenia refractaria que se atienden en el Hospital del Salvador de Valparaíso.

3.2. Objetivos específicos:

- Validar un método de biología molecular que distinga polimorfismos genéticos del CYP1A2.
- Establecer frecuencias para los polimorfismos CYP1A2*1C, CYP1A2*1F y CYP1A2*1D.
- Clasificar a pacientes según su capacidad metabólica para fármacos de uso psiquiátrico.

4. METODOLOGÍA

4.1. Características del estudio.

Estudio aprobado por el Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Valparaíso-San Antonio (Anexo 1: Acta de Aprobación) y que cuenta con los consentimientos informados de los participantes (Anexo 2: modelo de consentimiento informado) archivados por el Dr. Álvaro Cavieres. El estudio incluye la participación de 103 pacientes, según los criterios de inclusión y exclusión dispuestos (Tabla 4.1) y firma del consentimiento informado por cada uno de ellos.

La muestra con la que se trabajó correspondió a la totalidad de los pacientes y muestras disponibles para la realización del estudio. El número de individuos que participaron de la investigación conforman una población genóticamente representativa para la realización de esta tesis y permitió evaluar estadísticamente el desempeño de las técnicas de biología molecular.

4.2. Pacientes.

Los participantes del estudio correspondieron a pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria que reciben tratamiento en el Hospital del Salvador de Valparaíso, la que abarca individuos del área geográfica de toda la Región de Valparaíso, Chile. Los criterios de inclusión y exclusión se señalan en la Tabla 4.1. Bajo estos criterios el grupo experimental se constituyó por 88 individuos. Es importante indicar que, la información de los pacientes y los resultados del estudio fueron mantenidos bajo estricta confidencialidad.

Tabla 4.1: Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
-Diagnóstico de esquizofrenia refractaria a tratamiento convencional.	-Paciente con alguna coagulopatía y/o deficiencia leucocitaria.
-Paciente con más de un mes de tratamiento con clozapina.	-Voluntario no facultado mentalmente (según criterios clínicos) para aceptar el consentimiento informado.
-Paciente mayor de 18 años.	-No comprensión de algún término descrito en el consentimiento informado, previa explicación.
	-Manifestar intención de no participar en el estudio.

4.3. Toma de muestra.

Los pacientes no recibieron ningún fármaco ni tampoco fueron sometidos a procedimientos que pudieran significar la alteración física, emocional o psíquica ni a algún aparato, dispositivo de radiación o procedimientos quirúrgicos. Se extrajo 4-5mL de sangre por punción venosa, en duplicado a la vez, las que se recolectaron en tubos vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente anticoagulante por carecer de factores que pudieran interferir en etapas bioanalíticas posteriores. Este procedimiento fue realizado por enfermeras y personal de enfermería del policlínico del Hospital del Salvador de Valparaíso, en

espacios propios del Hospital del Salvador y provistos de todas las exigencias para realizar dicha labor. La obtención de muestras fue realizada entre el 19 de mayo del 2015, y el 17 de junio del 2016.

Una vez recolectada la muestra de sangre entera, esta se refrigeraba a 4°C hasta su transporte al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, conservando mediante un receptáculo refrigerado, junto a unidades refrigerantes, la cadena de frío de las muestras. A toda muestra recepcionada se le codificó con siglas alfa numérica correspondiente a una sigla propia del hospital más el número de la ficha médica del paciente.

4.4. Procesamiento y almacenamiento de las muestras.

Una vez recepcionadas en laboratorio, las muestras de sangre entera con EDTA de los pacientes fueron almacenadas sin algún otro tratamiento a -20°C, hasta ser sometidas al bioanálisis correspondiente.

4.5. Validación de las técnicas de biología molecular.

El análisis y validación del método molecular fueron realizados en las dependencias del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia.

4.5.1. Materiales y Reactivos.

La purificación y extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó con el sistema de extracción comercial *GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) provisto de proteinasa K, solución de lisis *-lysis solution-*, buffers de lavado concentrados I y II *-wash buffer I* y *II-*, buffer de elución *-elution buffer-* y columnas de purificación provistas de tubos colectores de 2mL. Adicionalmente se utilizó etanol absoluto para la dilución de los buffers de lavado y de elución, previo a la utilización de estos, así como fue utilizado de reactivo dentro del protocolo mismo. La extracción de ADNg se realizó en una cámara de bioseguridad categoría clase II Clean Bench DK-BCB001 (Daiki Science Co. Ltda., Seul, República de Corea). La calidad del material obtenido se evaluó espectrofotométricamente a 260, 230 y 280nm en un espectrofotómetro Nanodrop® (ThermoScientific, Massachusetts, USA).

Las reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se efectuaron en un termociclador convencional Thermal Cycler PXE05 (Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA) siguiendo especificaciones bibliográficas (Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 2003; Sachse et al., 1999) y del fabricante de los reactivos de PCR convencional. Para las PCR se utilizaron volúmenes de reacción de 25µL, compuesto por 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, Madison, Wisconsin, USA) compuesta de TaqDNA polimerasa, 400µM desoxinucleóticos de adenina, timina, guanina y citosina (dNTPs), 3mM cloruro de magnesio (MgCl₂) y buffer

para un pH de 8,5; 0,5µL de los partidores sentido y antisentido adquiridos en Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, USA), 10ng de ADNg y la cantidad suficiente de agua libre de nucleasa para completar 25µL. Los partidores establecidos para los análisis de PCR se denominan R2 y R3 para la variante CYP1A2*1C (rs2069514, -3860G>A); 11F y R4 para CYP1A2*1F (rs762551, -163C>A); y los partidores dTF y dTR para CYP1A2*1D (rs35694136, -2464T>delT) (Sachse et al., 2003). La secuencia de los partidores se muestra en la tabla 4.2. La preparación de la muestra se llevó a cabo en una cámara de bioseguridad categoría clase II Clean Bench DK-BCB001 (Daiki Science Co. Ltda., Seúl, República de Corea).

Tabla 4.2. Partidores empleados y sus secuencias genéticas.

Partidores (5'-3')		Tamaño (pb)
R2 (<i>forward</i>)	GCT ACA CAT GAT CGA GCT ATA C	22
R3 (<i>reverse</i>)	CAG GTC TCT TCA CTG TAA AGT TA	23
dTF (<i>forward</i>)	TGA GCC ATG ATT GTG GCA TA	20
dTR (<i>reverse</i>)	AGG AGT CTT TAA TAT GGA CCC AG	23
11F (<i>forward</i>)	TGA GGC TCC TTT CCA GCT CTC A	22
R4 (<i>reverse</i>)	AGA AGC TCT GTG GCC GAG AAG G	22

En la determinación de polimorfismos se utilizó el método de polimorfismos por longitud de fragmento de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), que utiliza una endonucleasa específica en los productos de PCR. Para esto se utilizó buffer específico para cada enzima provisto por Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) (BseLI: Buffer Tango 10X; NdeI: Buffer O 10X; Bsp120I: Buffer B 10X) una parte de agua libre de nucleasa (Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, USA), la endonucleasa específica para cada variante (BseLI: CYP1A2*1C; NdeI: CYP1A2*1D; Bsp120I: CYP1A2*1F) los componentes se mezclan en una razón de 2:18:10:1, respectivamente, en un volumen final de reacción de 10µL. Las muestras se someten a una incubación en seco utilizando un Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a temperaturas especificadas por la compañía y una inactivación térmica al finalizar. Las enzimas utilizadas fueron de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Los amplicones y fragmentos de restricción fueron detectados cualitativamente por electroforesis horizontal a voltaje constante (80V). Para esto se utilizaron geles elaborados con agarosa grado analítico para biología molecular (Fermelo, Santiago, Chile) y buffer Tris-Acetato-EDTA 1% (TAE 1X) (Bio-Rad, California, USA). La visualización fue realizada en presencia de bromuro de etidio (Apex, Indore Road, Ujjain), usando un transluminador UV (Vilbert Lourmat, Collégien, Francia) y/o utilizando un equipo de documentación de imágenes Geldoc (Bio-Rad, California,USA) para comprobar que su tamaño experimental coincidiera con el teórico, en cada corrida de gel se empleó un marcador de tamaño molecular de 100pb (Promega,Wisconsin, USA). La cámara de electroforesis horizontal y la fuente de poder son de la marca Bio-Rad (California, USA).

4.5.2. Extracción y purificación de ADN genómico.

Se emplearon 200µL de sangre entera con EDTA para la purificación mediante el GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit. El método de extracción se basa en la utilización de una columna compuesta de membrana en base a sílica. Las muestras son previamente digeridas con Proteinasa K y solución de lisis para degradar complejos proteicos y lipídicos, como membranas plasmáticas y nucleares. Posteriormente el lisado se mezcla con etanol y se agrega a la columna, donde el ADNg se adhiere a la sílica. Las impurezas del lisado se remueven con los distintos buffers de lavado (I y II) que se hacen pasar por la columna, para finalmente hacer eluir el ADNg bajo condiciones de baja fuerza iónica con 200µL de buffer de elución. El ADNg obtenido se almacenó a -20°C hasta efectuar la amplificación por PCR convencional. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016). En la Figura 4.1 se esquematiza el proceso de extracción de ADNg.

Para establecer la calidad del material extraído de cada muestra, se determinó la pureza frente a proteínas (absorbancia 260nm/280nm) y carbohidratos (260nm/230nm), y la concentración de ácidos nucleicos ante la absorbancia a 260nm. Todo esto utilizando un volumen de muestra de 2,0µL para análisis en el espectrofotómetro Nanodrop® (ThermoScientific, Massachusetts, USA). Además, se evaluó la integridad del ADN por electroforesis horizontal a 100V en gel de agarosa al 0,8%p/v.

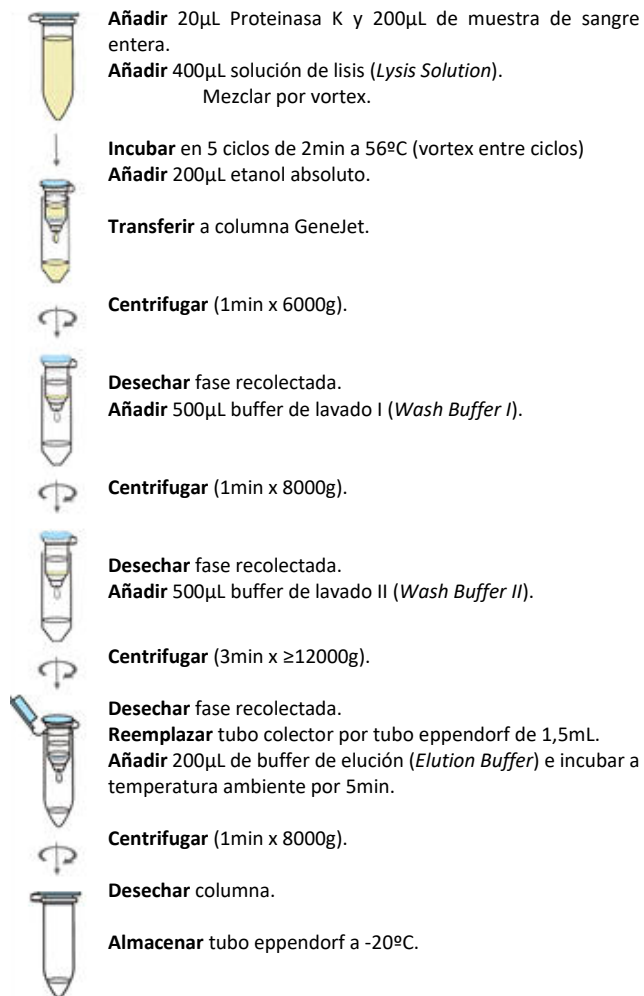


Figura 4.1. Diagrama del método de aislamiento y purificación de ADN. Técnica descrita para realización desde muestras de sangre entera, con adaptaciones generadas en el laboratorio de Biología Molecular. Sistema de reactivos: GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit. Fuente: adaptación (Thermo Fisher Scientific Inc., s. f.)

4.5.3. Detección del gen CYP1A2 y sus variantes.

4.5.3.1. Detección de la variante CYP1A2*1C (-3860G>A).

Se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP con la mezcla de reacción para PCR que consta de 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix 2X; 0,5µL de cada partidor; 10ng de ADN genómico; y agua libre de nucleasa suficiente para lograr los 25µL de volumen de reacción. Para esto se emplearon los partidores R2 y R3 con una duración de técnica de 2,5h, teniendo por condiciones para su desarrollo las especificadas en la Tabla 4.3. La secuencia génica amplificada y los partidores se señalan en la Figura 4.2. Posteriormente 3µL del producto de PCR se expuso a digestión enzimática con 3U de BseLI, incubada a 55°C por 2h, más una inactivación de 20min a 80°C.

Los productos de PCR y PCR-RFLP se resolvieron en gel de agarosa al 1,5%p/v a través de electroforesis horizontal a 100V por aproximadamente 1h. Los resultados posibles son:

- Patrón de tres bandas de 343 - 132 - 93pb que corresponde a un genotipo salvaje (G/G).
- Patrón de dos bandas de 475 - 93pb que corresponde a un genotipo homocigoto para la variante CYP1A2*1C (A/A).
- Patrón de cuatro bandas 475 - 343 - 132 - 93pb que determina la presencia de un genotipo heterocigoto (G/A).

Tabla 4.3. Partidores y protocolo de PCR-RFLP para CYP1A2*1C.

Partidores	Temperatura de alineamiento (°C)	Número de ciclos	Producto de PCR (pb)	Endonucleasa	Genotipo	Fragmentos (pb)
R2 (<i>f</i>)	60	35	568	BseLI	G/G	343 - 132 - 93
R3 (<i>r</i>)					G/A	475 - 343 - 132 - 93
					A/A	475 - 93

f=forward (sentido); *r*=reverse (antisentido)

(Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 2003; Sachse et al., 1999).



Figura 4.2.: Secuencias representativas del gen CYP1A2, que enmarca a la variante CTP1A2*1C. Los partidores se señalan con cuadrados. a) muestra la secuencia porción del gen que enmarcan a la variante, en dirección 5' → 3' (NCBI & NHGRI, 2010). b) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para el alelo G, salvaje, con sus respectivos sitios de reconocimiento de la endonucleasa remarcados en rojo. c) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para un alelo A, con ausencia de uno de los sitios de reconocimiento. Fuente: Diseño propio.

4.5.3.2. Detección de la variante CYP1A2*1D (-2464T>delT).

Se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP con la mezcla de reacción para PCR que consta de 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix 2X; 0,5µL de cada partidor; 10ng de ADN genómico; y agua libre de nucleasa suficiente para lograr 25µL de volumen de reacción. Para esto se utilizaron los partidores dTF y dTR, con una duración de técnica de 2,5h, teniendo por condiciones para su desarrollo las especificadas en la Tabla 4.4. La secuencia génica amplificada y los partidores se señalan en la Figura 4.3. En esta amplificación en particular se realiza un cambio de nucleótido en el sitio de acción de la enzima donde la secuencia génica presenta una citosina, para generar un producto de PCR con timina que termina facilitando el reconocimiento de la endonucleasa en presencia del alelo T. Posteriormente 3µL del producto de PCR fueron expuestos a digestión enzimática con 3U de NdeI, incubada a 37°C por 2h, más una inactivación de 20min a 80°C.

Los productos de PCR y PCR-RFLP se resolvieron en gel de agarosa al 2,0%p/v a través de electroforesis horizontal a 100V por aproximadamente 1h. Los resultados posibles son:

- Patrón de una banda de 167pb que corresponde a un genotipo salvaje (T/T).
- Patrón de dos bandas de 148 – 19pb que corresponde a un genotipo homocigoto para la variante CYP1A2*1D (delT/delT).
- Patrón de tres bandas 167 – 148 – 19pb que determina la presencia de un genotipo heterocigoto (delT/T).

Tabla 4.4. Partidores y protocolo de PCR-RFLP para CYP1A2*1D.

Partidores	Temperatura de alineamiento (°C)	Número de ciclos	Producto de PCR (pb)	Endonucleasa	Genotipo	Fragmentos (pb)
dTF (<i>f</i>)	49	35	167	NdeI	T/T	167
dTR (<i>r</i>)					T/delT	167 – 148 - 19
					delT/delT	148 - 19

f=forward (sentido); *r=reverse* (antisentido)

(Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 2003; Sachse et al., 1999).

5' -

a) TGCTTGGGCC CAGAAGTTCA AGACCAACCT GGGCAACATG GCAAGACCTC CTCTCTACAA
 AAAAATGTTT AAAAATAAAA AAATTAGCCA GGCATGGTGC ACACACCTGT GATTGTGGTC
 CCAGCTACTC AGGAGGCTGA GGCAAGAGGA TTGTTTGAGC TCAGGAGGTC GAGGCTGCAG

→ Δ dTF

TGAGCCATGA TTGTGGCA **T/delT** GAACCCCAAC CTGGGTGACA GAGCAAGACT
 CTGTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAGATAGC AAAC TTCCTT TTCACATCCA ATTTAAGGCT
 TGTCTCCTC CTCCTCTTAG ATCTGACTGA GATCTGGGTC CATATTAAAG ACTCCTTTAG

Δ dTR ←

TACAACAAAC ACCATATATC CTCACGTAAG TCCATGAATA TCTGACATTT CTCATATCTA
 CTTTCTCTCG ATTTATTGAT AGATAGGTAT ACATTGTTTT AATTTTATGG GTACATAGTA

5' -

b) TGAGCCATGA TTGTGGCA ↓ **T** GAACCCCAAC CTGGGTGACA GAGCAAGACT
 CTGTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAGATAGC AAAC TTCCTT TTCACATCCA ATTTAAGGCT
 TGTCTCCTC CTCCTCTTAG ATCTGACTGA GATCTGGGTC CATATTAAAG ACTCCT -3'

5' -

c) TGAGCCATGA TTGTGGCATA GAACCCCAAC CTGGGTGACA GAGCAAGACT CTGTATCTAA
 AAAAAAAAAA AAAAGATAGC AAAC TTCCTT TTCACATCCA ATTTAAGGCT TGTCTCCTC
 CTCCTCTTAG ATCTGACTGA GATCTGGGTC CATATTAAAG ACTCCT -3'

Figura 4.3.: Secuencias representativas del gen CYP1A2, que enmarca a la variante CTP1A2*1D. Los partidores se señalan con triángulos. a) muestra la secuencia porción del gen que enmarcan a la variante, en dirección 5'→3' (NCBI & NHGRI, 2010). b) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para un alelo T, salvaje, con su respectivo sitio de reconocimiento de la endonucleasa remarcado en rojo. c) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para un alelo delT con ausencia de sitio de reconocimiento. Fuente: Diseño propio.

4.5.3.3. Detección de la variante CYP1A2*1F (-163C>A).

Se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP con la mezcla de reacción para PCR constituida por 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix 2X; 0,5µL de cada partidor; 10ng de ADN genómico; y agua libre de nucleasa suficiente para lograr 25µL de volumen de reacción. Para esto se utilizaron los partidores 11F y R4, con una duración de técnica de 2,5h, teniendo por condiciones para su desarrollo las especificadas en la Tabla 4.5. La secuencia génica amplificada y los partidores se señalan en la Figura 4.4. Posteriormente 3µL del producto de PCR fueron sometidos a digestión enzimática con 3U de Bsp120I, incubada a 37°C por 2h, más una inactivación de 20min a 80°C.

Los productos de PCR y PCR-RFLP se resolvieron en gel de agarosa al 2,0%p/v a través de electroforesis horizontal a 100V por aproximadamente 1h. Los resultados posibles son:

- Patrón de una banda de 211 - 54pb que corresponde a un genotipo salvaje (C/C).
- Patrón de dos bandas de 265pb que corresponde a un genotipo homocigoto para la variante CYP1A2*1F (A/A).
- Patrón de tres bandas 265 - 211 - 54pb que determina la presencia de un genotipo heterocigoto (C/A).

Tabla 4.5. Partidores y protocolo de PCR-RFLP para CYP1A2*1F.

Partidores	Temperatura de alineamiento (°C)	Número de ciclos	Producto de PCR (pb)	Endonucleasa	Genotipo	Fragmentos (pb)
11F (<i>f</i>)	62	35	265	Bsp120I	C/C	211 – 54
R4 (<i>r</i>)					C/A	265 – 211 – 54
					A/A	265

f=forward (sentido); *r*=reverse (antisentido)

(Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 2003; Sachse et al., 1999).

5' -

a) GTATATGGAA GGTATCAGCA GAAAGCCAGC ACTGGCAGGG ACTCTTTGGT ACAATACCCA
GCATGCATGC TGTGCCAGGG GCTGACAAGG GTGCTGTCCT TGGCTTCCCC ATTTTGGAGT
GGTCACTTGC CTCTACTCCA GCCCCAGAAG TGGAAACTGA GATGATGTGT GGAGGAGAGA

→ ○11F

GCCAGCGTTC ATGTTGGGAA TCTTGAGGCT CTTTCCAGC TCTCAGATTC TGTGATGCTC
AAAGGGTGAG CTCTGTGGGC **C/A** CAGGACGCAT GGTAGATGGA GCTTAGTCTT
TCTGGTATCC AGCTGGGAGC CAAGCACAGA ACACGCATCA GTGTTTATCA AATGACTGAG
GAAATGAATG AATGAATGTC TCCATCTCAA CCCTCAGCCT GGTCCCTCCT TTTTCCCTG
CAGTTGGTAC AGATGGCATT GTCCCAGTCT GTTCCCTTCT CGGCCACAGA GCTTCTCCTG

○R4 ←

GCCTCTGCCA TCTTCTGCCT GGTATTCTGG GTGCTCAAGG GTTTGAGGCC TCGGGTCCCC
AAAGGCCTGA AAAGTCCACC AGAGCCATGG GGCTGGCCCT TGCTCGGGCA TGTGCTGACC
CTGGGGAAGA ACCCGCACCT GGCAGTGTCA AGGATGAGCC AGCGCTACGG GGACGTCTG

5' - -3'

b) TGAGGCT CTTTCCAGC TCTCAGATTC TGTGATGCTC AAAGGGTGAG CTCTGTG ↓
GGC **C** CAGGACGCAT GGTAGATGGA GCTTAGTCTT TCTGGTATCC AGCTGGGAGC
CAAGCACAGA ACACGCATCA GTGTTTATCA AATGACTGAG GAAATGAATG AATGAATGTC
TCCATCTCAA CCCTCAGCCT GGTCCCTCCT TTTTCCCTG CAGTTGGTAC AGATGGCATT
GTCCCAGTCT GTTCCCTTCT CGGCCACAGA GCTTCT-3'

5' -

c) TGAGGCT CTTTCCAGC TCTCAGATTC TGTGATGCTC AAAGGGTGAG CTCTGTGGGC
A CAGGACGCAT GGTAGATGGA GCTTAGTCTT TCTGGTATCC AGCTGGGAGC
CAAGCACAGA ACACGCATCA GTGTTTATCA AATGACTGAG GAAATGAATG AATGAATGTC
TCCATCTCAA CCCTCAGCCT GGTCCCTCCT TTTTCCCTG CAGTTGGTAC AGATGGCATT
GTCCCAGTCT GTTCCCTTCT CGGCCACAGA GCTTCT-3'

Figura 4.4.: Secuencias representativas del gen CYP1A2, que enmarca a la variante CYP1A2*1F. Los partidores se señalan con círculos. a) muestra la secuencia porción del gen que enmarcan a la variante, en dirección 5'→3' (NCBI & NHGRI, 2010). b) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para un alelo C, salvaje, con su respectivo sitio de reconocimiento de la endonucleasa remarcado en rojo. c) señala el fragmento de PCR tras amplificación, para un alelo A con ausencia de sitio de reconocimiento. Fuente: Diseño propio.

4.5.4. Validación de la metodología.

4.5.4.1. Selectividad.

La selectividad de la metodología se efectuó mediante comprobación por secuenciación de cada genotipo caracterizado en la población de estudio. Para ello, los productos de PCR fueron purificados desde el gel de electroforesis utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), el que permite separar el amplicón al disolver la agarosa y aumentar la afinidad de la secuencia del ADN por una matriz sólida, basándose en un principio de cromatografía de adsorción. Luego de lavar las soluciones e interferencias concomitantes al amplicón, se realiza la elución de la secuencia de ADN pura disuelta en agua libre de nucleasas. Las muestras así tratadas fueron enviadas al Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para su procesamiento automático en un equipo ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, California, USA), que realizó electroforesis capilar en base al kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

La secuenciación obtenida del amplicón fue estudiada usando el software FinchTV para su comparación con la secuencia estándar del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). La homología entre el amplicón obtenido y el teórico confirma la selectividad de la técnica.

4.5.4.2. Límite de Detección.

Se evaluó la cantidad mínima de ADN genómico necesaria para poder detectar el fragmento a amplificar por termociclado, a partir de una muestra de concentración conocida y diluida sistemáticamente en factores de diez, con agua libre de nucleasas. Se generaron siete diluciones seriadas en base a un factor de dilución de diez que fueron rotuladas de "A" hasta "G" para generar muestras con cantidades decrecientes de ADNg de 1,0 hasta 0,000001ng. Las diluciones se sometieron a las mismas condiciones de mezcla, reacción y visualización establecidas para la detección de cada uno de los polimorfismos, determinándose así la cantidad mínima requerida para detectar la secuencia en una muestra hipotética. Las bandas que se buscó detectar para el polimorfismo CYP1A2*1C corresponde a una señal a 568pb, para CYP1A2*1D a 167pb y en el caso de CYP1A2*1F a 265pb.

5.RESULTADOS

5.1. Calidad del ADN genómico extraído.

Las muestras procesadas por GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) fueron analizadas espectrofotométricamente y los resultados son expuestos en la Tabla 5.1. Los parámetros de concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$), pureza a (260/280) y (260/230) se expresan por sus valores promedios y como rangos (mínimo-máximo) de cada parámetro respectivo.

Tabla 5.1. Resultados obtenidos tras aislamiento y purificación de ADN.

Parámetro	260/280	260/230	Concentración ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
Valor promedio	$1,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,5$	$22,0 \pm 10,0$
Rango de valores	[1,03 – 2,22]	[0,21 - 2,52]	[4,40 - 50,3]

Para determinar la integridad del ADN genómico en las muestras purificadas, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8%p/v. Se evaluaron muestras con distintas concentraciones (10, 20, 30, 40 y $50\text{ng}/\mu\text{L}$) y muestras con bajas razones de absorbancia (260/280 y 260/230). Los resultados se presentan en la Figura 5.1 y permiten señalar que no se observan señales de degradación o pérdida de integridad del material genético, incluso en muestras de bajo rendimiento.

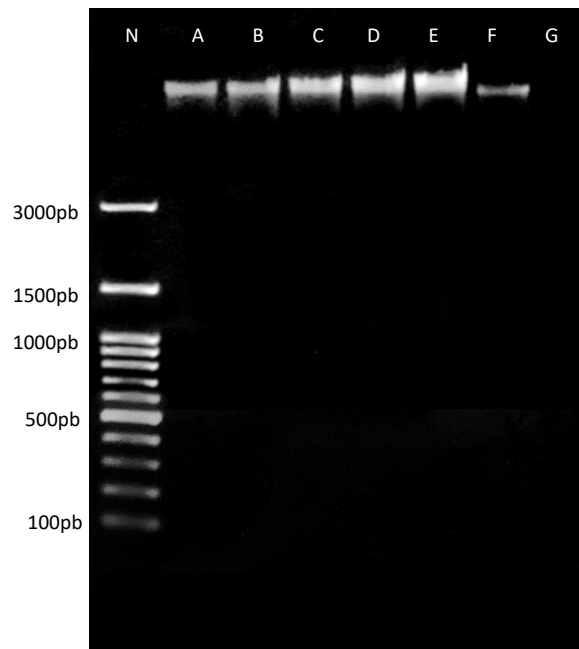


Figura 5.1.: Gel de integridad de ADN en gel de agarosa al 0,8%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. A-E corresponden a ADN genómico en concentraciones crecientes con índices de pureza de 260/180 y 260/230 de alrededor de 2,00. Mientras F-G cuentan con bajas concentraciones de ADN genómico y bajas purezas a 260/280 (1,27) y 260/230 (0,21), respectivamente.

5.2. Detección de la variante CYP1A2*1C (rs2069514, -3860G>A).

Los resultados concebibles del PCR-RFLP responden según la presencia del alelo G, alelo A o ambos. Para esto se utilizó la endonucleasa BseII, que tiene actividad sobre la secuencia 5'-CC-XXXXXX-GG-3', la que está presente en dos instancias dentro del producto de PCR para la zona promotora del gen CYP1A2. Por lo tanto, el alelo G correspondiente para el genotipo heterocigoto u homocigoto salvaje permite la acción de la endonucleasa en dos puntos de la secuencia amplificada, al presentar las secuencias 5'-CC-GCCTCTC-GG-3' y 5'-CC-CCCTCAA-GG-3'. No así el alelo A presente en el genotipo heterocigoto u homocigoto para la variante, que contiene la secuencia 5'-CC-GCCTCTC-AG-3' y 5'-CC-CCCTCAA-GG-3'; de estas, la primera no es reconocida por la enzima, y ocurre como resultado de la transición génica de una base G por A en la sección 5'-CC-GCCTCTC-GG-3'. Esto otorga como resultado tres posibles patrones de bandas para cada genotipo específico, lo que se expone en el diagrama de la figura 5.2.A Por otra parte, resultados representativos son presentados en la figura 5.2.B.

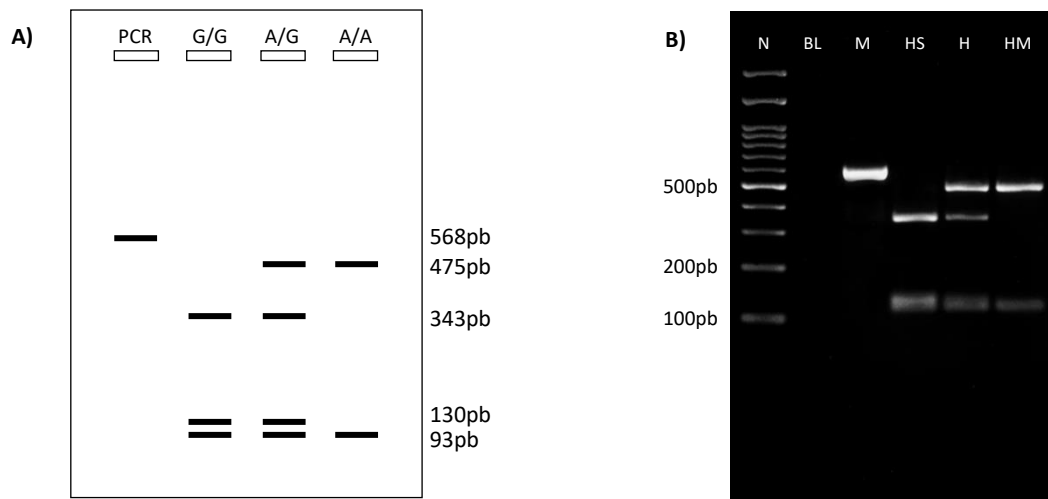


Figura 5.2.: Diagrama y fotografía de los resultados representativos para la variante -3860G>A. **A)** Diagrama de los resultados para la detección de la variante -3860G>A mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa BseII. De izquierda a derecha se observa el resultado de una muestra reactiva para PCR sin digestión enzimática con una banda a 568pb; le sigue el patrón homocigoto salvaje (G/G) que muestra tres bandas de 343, 130 y 93pb resultantes de la incisión de dos sitios reconocibles por la enzima; un heterocigoto (A/G) que presenta cuatro bandas, tres de ellas de 343, 130 y 93pb correspondientes al alelo G, y dos bandas a 475 y 93pb aportadas por el alelo A; y un patrón homocigoto para el SNP de interés (A/A) con dos bandas a 475 y 93pb. **B)** Fotografía representativa de los análisis del estudio para la variante -3860G>A en gel de agarosa al 2,5%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL, corresponde al control negativo. M responde al producto de PCR sin digerir con una banda de 568pb; HS es un resultado de homocigoto salvaje con tres bandas visibles en 343, 130 y 93pb (G/G); H el genotipo heterocigoto con cuatro bandas distinguibles en 475, 343, 130 y 93pb (A/G); y HM corresponde al genotipo homocigoto variante con dos bandas a 475 y 93pb (A/A).

5.2.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1C.

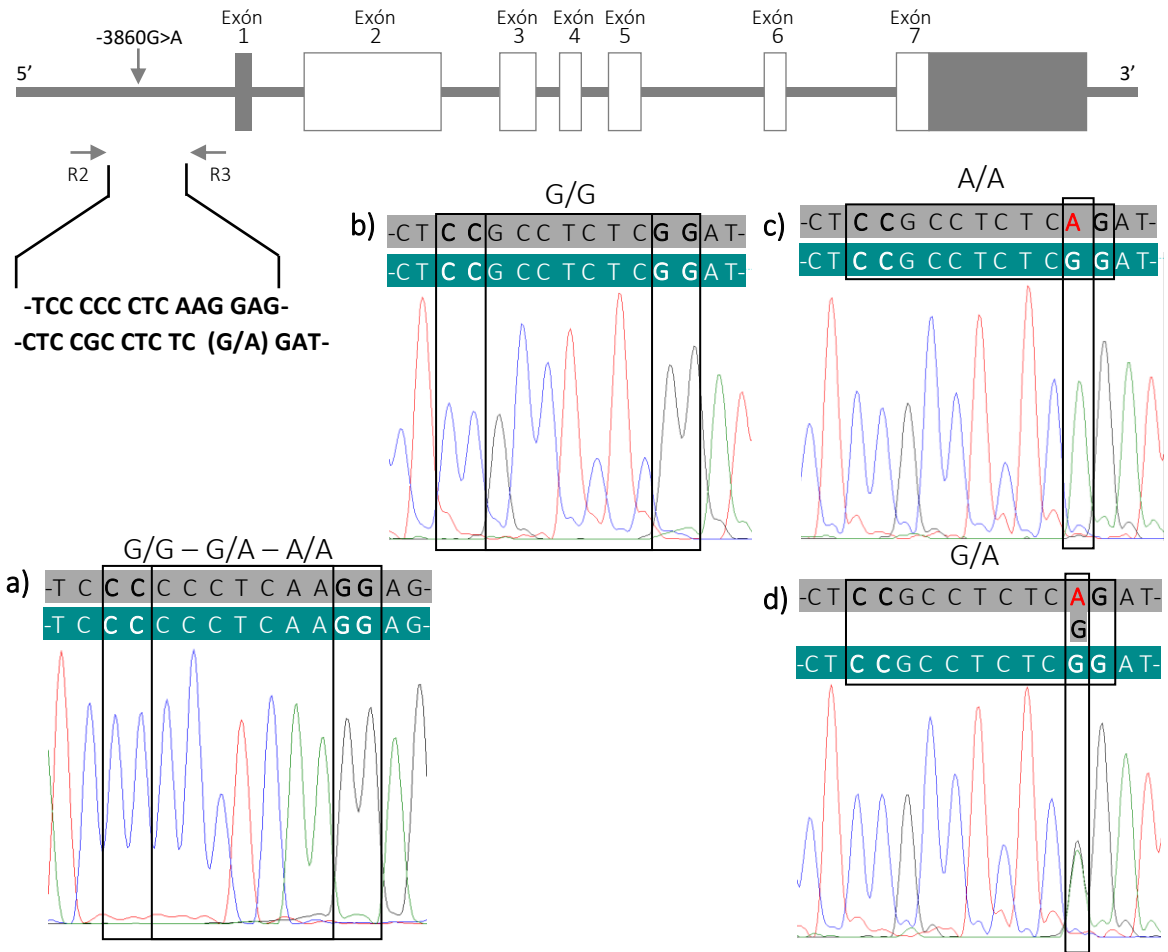


Figura 5.3.: Cromatogramas de secuenciación para la variante -3860G>A. Las secuencias escritas en color azul corresponden a la secuencia teórica, y la secuencia en color gris corresponde a la secuencia arrojada por el equipo, así mismo las bases de color rojo indican no concordancia según base teórica y señal analítica. **a)** Señal de secuenciación a la distancia de 70-90pb que demarca sitio de reconocimiento para la endonucleasa BseI compartida en los tres genotipos G/G, G/A y A/A. **b)** Señal de secuenciación a la distancia de 420-440pb que indica sitio de reconocimiento para la endonucleasa confirmando genotipo homocigoto salvaje (G/G). **c)** Señal de secuenciación a la distancia de 420-440pb que muestra una señal fluorescente roja en vez de una azul, denotando la transición génica del SNP -3860G>A, confirmando genotipo homocigoto para la variante (A/A). **d)** Señal de secuenciación a la distancia de 420-440pb que muestra solapamiento de señales de fluorescencia azul y roja, indicando transición genética en uno de los alelos de guanina por adenina, confirmando genotipo heterocigoto para la variante (A/G).

Para analizar el parámetro de selectividad del PCR-RFLP para la variante -3860G>A, se obtuvo la cromatografía de secuenciación específica para muestras de cada genotipo obtenido experimentalmente (Figura 5.3.). En primer lugar los tamaños y número de amplicones fueron concordantes con los recopilados de la bibliografía para la misma variante. La posterior secuenciación de los amplicones, sin digerir, correspondientes a cada

genotipo fueron consistentes con los fragmentos de restricción observados. En consecuencia, la metodología se considera selectiva

Por otro lado, el análisis del límite de detección indicó que para obtener una PCR exitosa con una banda de 568pb, es necesario una mezcla de reacción con al menos 0,01ng de ADN genómico (Figura 5.4.); cantidades inferiores no permiten detectar la banda necesaria para que su posterior digestión por endonucleasa.

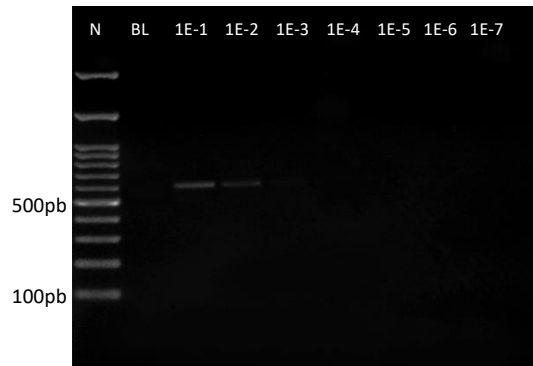


Figura 5.4.: Límite de detección para la variante -3860G>A en gel de agarosa 1,5%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL: control negativo de la corrida. 1E-1 a 1E-7 corresponde a cantidades en nanogramos de ADN genómico (0,1 – 0,0000001ng) empleado para la amplificación por PCR.

5.3. Detección de la variante CYP1A2*1D (rs35694136, -2464T>delT).

Los posibles resultados del PCR-RFLP responden según la presencia del alelo T, delección del alelo T y desplazamiento del marco de lectura o ambos. Para esto se utilizó la endonucleasa NdeI, que tiene actividad sobre la secuencia 5'-CAT ATG-3', la que está presente en dos instancias dentro del producto de PCR para la zona promotora del gen CYP1A2. Por lo tanto, el alelo T correspondiente para el genotipo heterocigoto u homocigoto salvaje permite la acción de la endonucleasa en un punto de la secuencia amplificada, en 5'-CAT ATG-3'. No así el alelo delT presente en el genotipo heterocigoto u homocigoto para la variante, que contiene la secuencia 5'-CAT A-G-3' que no es reconocida por la enzima, y resulta de la delección del nucleótido T en la sección 5'-CAT ATG-3'. Esto genera como resultado tres posibles patrones de bandas para cada genotipo específico, lo que se expone en la figura 5.5.A. Por otra parte, resultados representativos son presentados en la figura 5.5.B.

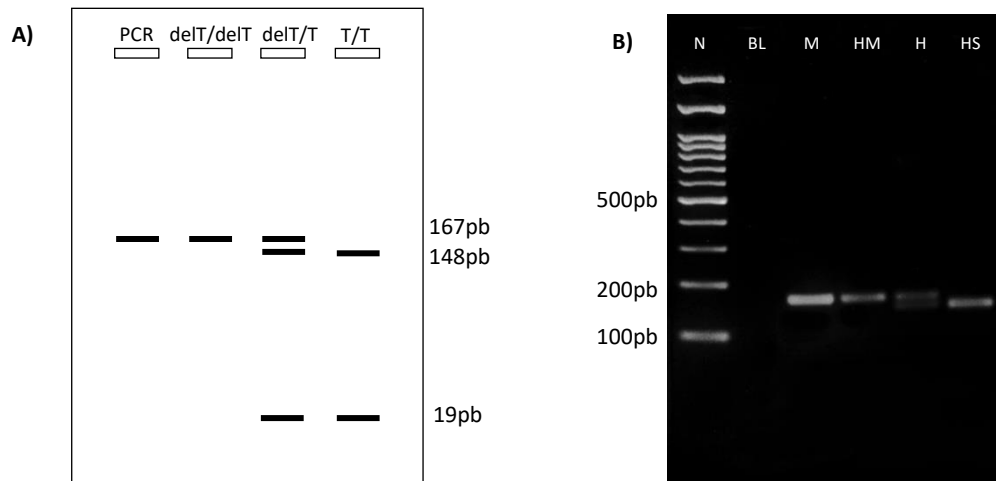


Figura 5.5.: Diagrama y fotografía de los resultados representativos para la variante -2464T>delT. **A)** Diagrama de los resultados para la detección de la variante -2464T>delT mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa NdeI. De izquierda a derecha se observa el resultado de una muestra reactiva para PCR sin digestión enzimática con una banda a 167pb; le sigue el patrón homocigoto de la variante (delT/delT) que muestra una banda a 167pb resultante del no reconocimiento de la enzima; un heterocigoto (delT/T) que presenta tres bandas, una de ellas de 167pb correspondientes al alelo delT, y dos bandas a 148 y 19pb aportadas por el alelo T; y un patrón homocigoto salvaje (T/T) con dos bandas a 148 y 19pb. **B)** Fotografía representativa de los análisis del estudio para la variante -2464T>delT en gel de agarosa al 2,5%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL, corresponde al control negativo. M responde al producto de PCR sin digerir con una banda de 167pb; HM es un resultado de homocigoto de la variante con banda visible en 167pb (delT/delT); H el genotipo heterocigoto con bandas distinguibles en 167pb y 148pb (delT/T); y HS corresponde al genotipo homocigoto salvaje con banda visible a 148pb (T/T).

5.3.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1D.

Para analizar el parámetro de selectividad del PCR-RFLP para la variante -2464T>delT, se obtuvo la

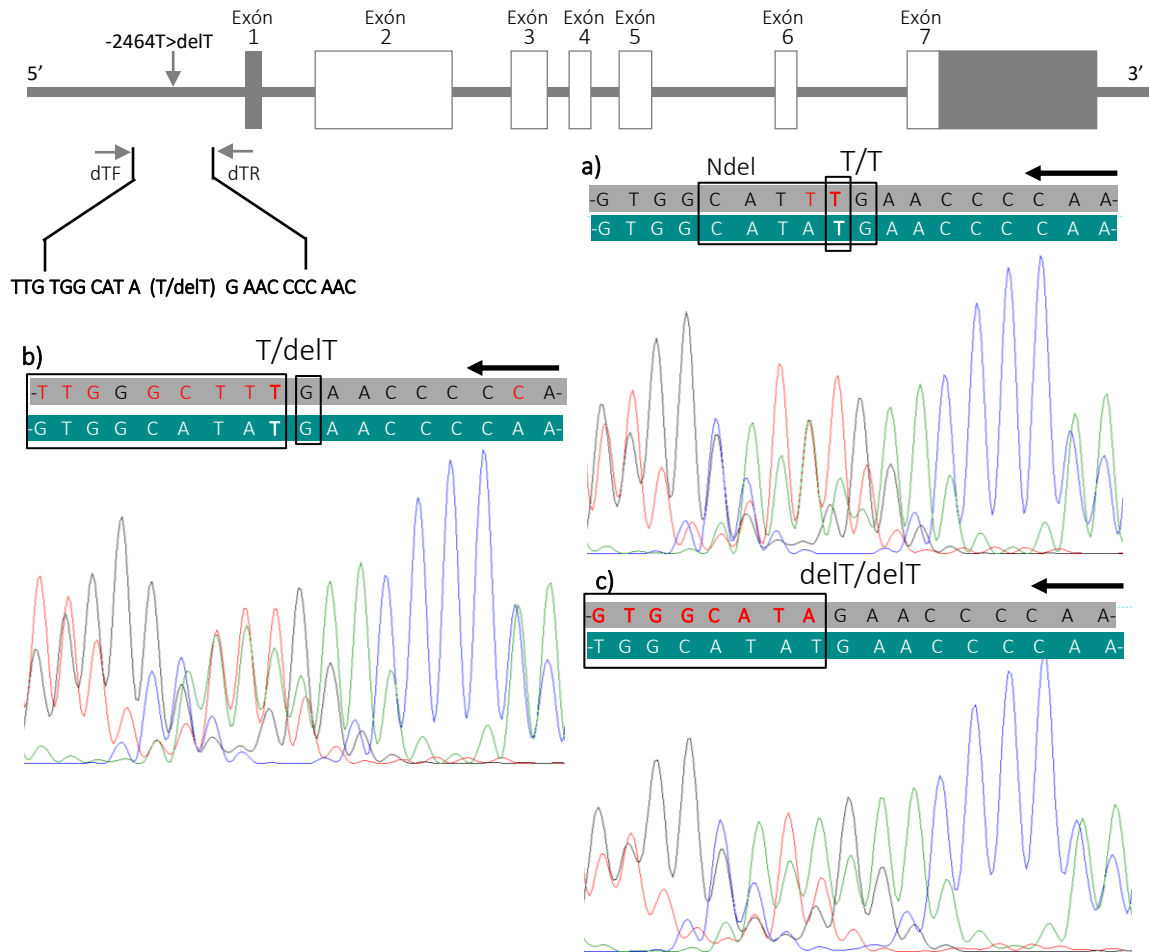


Figura 5.6.: Cromatogramas de secuenciación para la variante -2464T>delT. Las flechas indican la dirección en que se realizó la técnica de secuenciación. Las secuencias escritas en color azul corresponden a la secuencia teórica, y la secuencia en color gris corresponde a la secuencia arrojada por el equipo, así mismo las bases de color rojo indican no concordancia según base teórica y señal analítica. **a)** Señal indica sitio de reconocimiento para la endonucleasa Ndel, con presencia de alelo T, confirmando genotipo homocigoto salvaje (T/T). **b)** Señal de secuenciación que muestra conflicto en la señal por desplazamiento parcial del marco de lectura a partir de la última guanina en común sin sentido aparente, indicando así una probable delección genética en uno de los alelos, y un posible genotipo heterocigoto para la variante (T/delT). **c)** Señal de secuenciación que muestra ausencia de señal intensa de fluorescencia roja donde debiese estar la base timina, concordando con un seguido desplazamiento del marco de lectura en solo una base, y por consiguiente una probable delección y un posible genotipo homocigoto para la variante (delT/delT).

cromatografía de secuenciación específica para cada genotipo obtenido experimentalmente. En primer lugar, los amplicones concordaron en longitudes y número de bandas con las recopiladas de la bibliografía para la

misma variante (Figura 5.6.). Sin embargo, los datos de secuenciación no permitieron validación de la metodología.

Por otra parte, el análisis del límite de detección indica que para obtener una PCR exitosa con una banda de 167pb, es necesario una mezcla de reacción con al menos 0,1ng de ADN genómico (Figura 5.7.); cantidades inferiores no permiten detectar la banda necesaria para que su posterior digestión por endonucleasa.



Figura 5.7.: Límite de detección para la variante -2464T>delT en gel de agarosa 2%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL: blanco negativo de la corrida. 1E-1 a 1E-7 corresponde a cantidades en nanogramos de ADN genómico (0,1 – 0,0000001ng) empleado para la amplificación por PCR.

5.4. Detección de la variante CYP1A2*1F (rs762551, -163C>A).

Los resultados esperables del PCR-RFLP responden según la presencia del alelo C, alelo A o ambos. Para esto se utilizó la endonucleasa Bsp120I, que tiene actividad sobre la secuencia 5'-GGG CCC-3', la que está presente en dos instancias dentro del producto de PCR para la zona promotora del gen CYP1A2. Por lo tanto, el alelo C correspondiente para el genotipo heterocigoto u homocigoto salvaje permite la acción de la endonucleasa en un punto de la secuencia amplificada, en 5'-GGG CCC-3'. No así el alelo A presente en el genotipo heterocigoto u homocigoto para la variante, que contiene la secuencia 5'-GGG CAC-3' que no es reconocida por la enzima, y resulta del cambio de base C por A en la sección 5'-GGG CCC-3'. Esto genera como resultado tres posibles patrones de bandas para cada genotipo específico, lo que se expone en el diagrama de la figura 5.8.A. Por otra parte, en la figura 5.8.B se presentan resultados representativos.

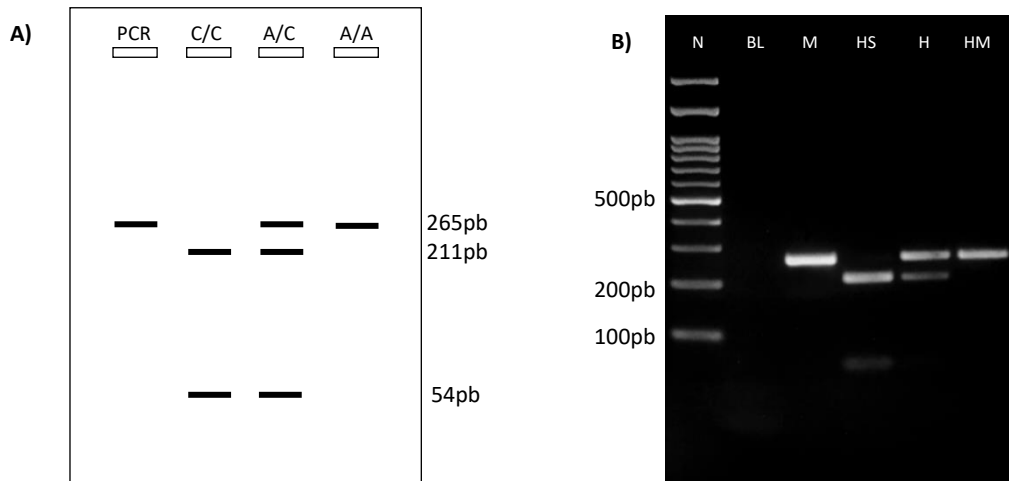


Figura 5.8.: Diagrama y fotografía de los resultados representativos para la variante -163C>A. **A)** Diagrama de los resultados para la detección de la variante -163C>A mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa Bsp120I. De izquierda a derecha se observa el resultado de una muestra reactiva para PCR sin digestión enzimática con una banda a 265pb; le sigue el patrón homocigoto salvaje (C/C) que muestra dos banda a 211 y 54pb resultantes del reconocimiento de la enzima; un heterocigoto (A/C) que presenta tres bandas, dos de ellas de 211 y 54pb correspondientes al alelo C, y una banda a 265pb aportada por el alelo A, por no ser reconocida por la enzima; y un patrón homocigoto para el SNP de interés (A/A) con una banda a 265pb. **B)** Fotografía representativa de los análisis del estudio para la variante -2464T>delT en gel de agarosa al 2,5%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL, corresponde al control negativo. M responde al producto de PCR sin digerir con una banda de 265pb; HS es un resultado de homocigoto salvaje con dos bandas visibles en 211 y 54pb (C/C); H el genotipo heterocigoto con bandas distinguibles en 265, 211 y una tenue banda a 54pb (A/C); y HM corresponde al genotipo homocigoto variante con banda visible a 265pb (A/A).

5.4.1. Selectividad y límite de detección para la variante CYP1A2*1F.

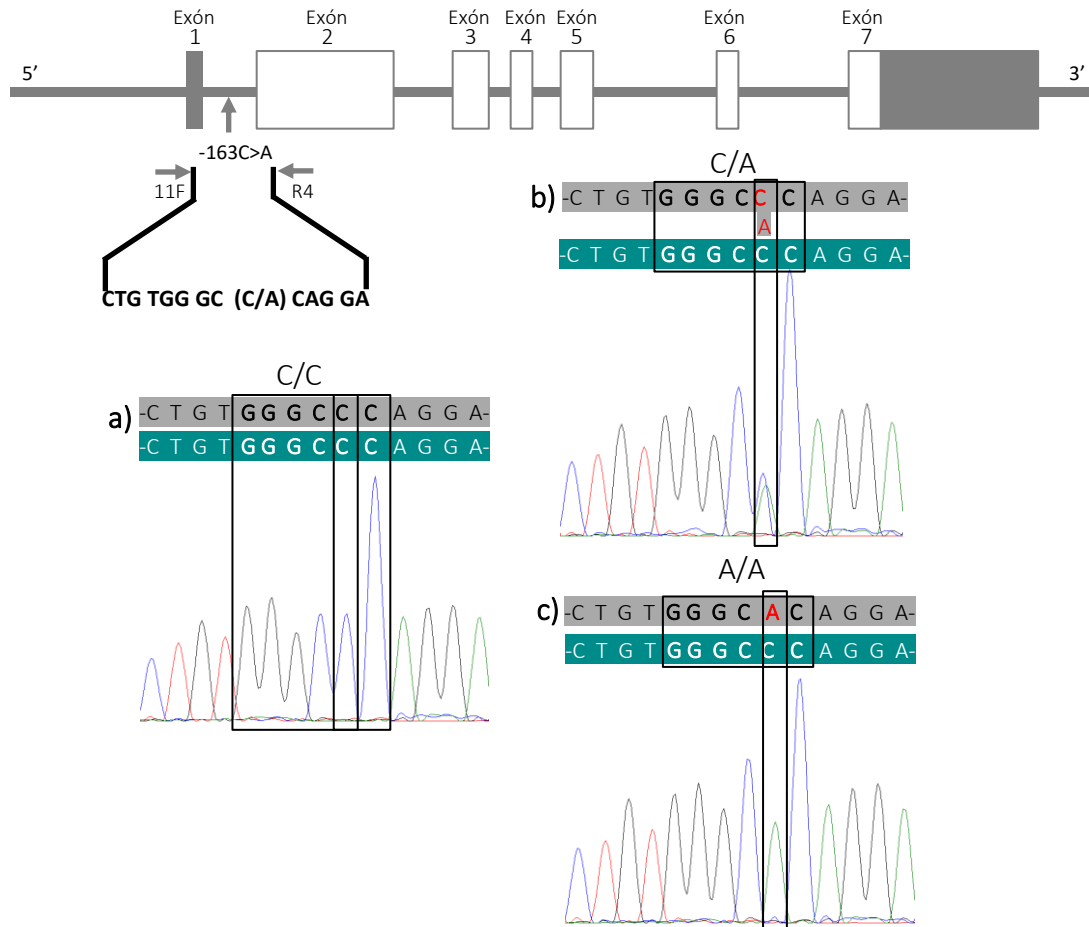


Figura 5.9.: Cromatogramas de secuenciación para la variante -163C>A. Las secuencias escritas en color azul corresponden a la secuencia teórica, y la secuencia en color gris corresponde a la secuencia arrojada por el equipo, así mismo las bases de color rojo indican no concordancia según base teórica y señal analítica. **a)** Señal de secuenciación a la distancia de 20pb del producto de PCR, que indica sitio de reconocimiento para la endonucleasa, confirmando genotipo homocigoto salvaje (C/C). **b)** Señal de secuenciación a la distancia de 20pb del producto de PCR, que muestra solapamiento de señales de fluorescencia azul (C) y verde (A), indicando transversión genética en uno de los alelos, confirmando genotipo heterocigoto para la variante (C/A). **c)** Señal de secuenciación a la distancia de 20pb del producto de PCR, que muestra una señal fluorescente verde (A) en vez de una azul (C), denotando la transversión genética del SNP -167C>A, confirmando genotipo homocigoto para la variante (C/C). Fuente: diseño propio.

Para analizar el parámetro de selectividad del PCR-RFLP para la variante -163C>A, se obtuvo la cromatografía de secuenciación específica para cada genotipo obtenido experimentalmente. En primer lugar, los amplicones concuerdan en número y longitud con los recopilados de la bibliografía para la misma variante (Figura 5.9.). En este caso, los resultados de la secuenciación permiten validar la metodología empleada al existir concordancia entre la secuenciación teórica y la obtenida experimentalmente.

Por otra parte, el análisis del límite de detección indicó que para obtener una PCR exitosa con una banda de 265pb, es necesario una mezcla de reacción con al menos 0,01ng de ADN genómico (Figura 5.10.); cantidades inferiores no permiten detectar la banda necesaria para que su posterior digestión por endonucleasa.



Figura 5.10.: Límite de detección para la variante -163C>A en gel de agarosa 2%p/v. En N se visualiza el marcador de tamaño molecular de 100pb. BL: blanco negativo de la corrida. 1E-1 a 1E-7 corresponde a cantidades en nanogramos de ADN genómico (0,1 – 0,0000001ng) empleado para la amplificación por PCR.

5.5. Tablas resumen de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos experimentalmente, para la detección de los tres SNPs determinados en esta investigación, se indican en las Tablas 5.1, 5.2, 1.3 (mayor detalle en página 10), 5.3 y 5.4. Las tablas presentan análisis estadísticos correspondientes a Chi-cuadrado y equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 5.1.: Resultados de frecuencia alélica para las variantes CYP1A2*1C (-3860G>A), CYP1A2*1D (-2464T>delT) y CYP1A2*1F (-163C>A).

Polimorfismo	Alelo	Frecuencia Alélica		
		n=176	%	IC (95%)
CYP1A2*1C -3860G>A	G	118	67,0	57,8-76,2
	A	58	33,0	23,8-42,2
CYP1A2*1D -2464T>delT	T	111	63,1	53,6-72,6
	delT	65	36,9	27,4-46,4
CYP1A2*1F -163C>A	C	50	28,4	19,6-37,2
	A	126	71,6	62,8-80,4

IC=Intervalo de confianza.

Tabla 5.2.: Resultados de frecuencia genotípica para las variantes CYP1A2*1C (-3860G>A), CYP1A2*1D (-2464T>delT) y CYP1A2*1F (-163C>A).

Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia genotípica			HW valor-p
		n=88	%	IC (95%)	
CYP1A2*1C -3860G>A	G/G	41	46,6	36,8-56,4	0,4862
	G/A	36	40,9	31,3-50,5	
	A/A	11	12,5	6,00-19,0	
CYP1A2*1D -2464T>delT	T/T	36	40,9	31,3-50,5	0,6481
	T/delT	39	44,3	34,6-54,0	
	delT/delT	13	14,8	7,80-21,8	
CYP1A2*1F -163C>A	C/C	5	5,7	1,20-10,2	0,2705
	C/A	40	45,5	35,7-55,3	
	A/A	43	48,9	39,1-58,7	

IC=Intervalo de confianza.

Tabla 1.3. Número de referencia para polimorfismos del gen CYP1A2, genotipos y fenotipo respectivo.

Nombre del alelo	Número de referencia SNPs (rs)	Polimorfismo (SNP)	Genotipo	Inducibilidad/Actividad
*1A (salvaje)	n/a	n/a	salvaje	Normal
*1C	rs 2069514	-3860 G → A	G/G	Normal
			A/G	Normal
			A/A	Aumentada
*1D	rs 35694136	-2464 T → delT	T/T	Normal
			delT/T	Normal
			delT/delT	Aumentada
*1F	rs 762551	-163 C → A	C/C	Disminuida
			C/A	Sin efecto
			A/A	Aumentada

Tabla 5.3.: Resultados de constelaciones alélicas y sus frecuencias genotípicas presentes en la población.

Constelaciones alélicas			Frecuencia		
-3860G>A	-2464T>delT	-163C>A	n=88	%	IC (95%)
G/G	T/T	C/C	5	5,68	1,10-10,2
G/G	T/T	C/A	19	21,59	13,5-29,7
G/G	T/delT	C/A	5	5,68	1,10-10,2
G/G	T/T	A/A	10	11,36	5,10-17,6
G/A	T/delT	C/A	14	15,91	8,70-23,1
A/G	T/delT	A/A	20	22,73	14,5-30,9
A/A	T/delT	A/A	1	1,14	0,00-3,20
G/A	delT/delT	A/A	1	1,14	0,00-3,20
A/A	T/T	A/A	10	11,36	5,10-17,6
G/G	delT/delT	C/A	1	1,14	0,00-3,20
G/A	T/T	A/A	1	1,14	0,00-3,20
G/G	T/delT	A/A	1	1,14	0,00-3,20

IC=Intervalo de confianza.

Tabla 5.4.: Frecuencias de constelaciones alélicas, fenotipo más probable y correlación con la respuesta clínica a la farmacoterapia.

Constelaciones alélicas			Fenotipo posible	
-3860G>A	-2464T>delT	-163C>A	% (n=88)	Metabolizador (M)
G/G	T/T	C/C	5,68	E
G/G	T/T	C/A	21,59	E
G/G	T/delT	C/A	5,68	E
G/G	T/T	A/A	11,36	U
G/A	T/delT	C/A	15,91	E
A/G	T/delT	A/A	22,73	U
A/A	T/delT	A/A	1,14	E
G/A	delT/delT	A/A	1,14	U
A/A	T/T	A/A	11,36	E
G/G	delT/delT	C/A	1,14	E
G/A	T/T	A/A	1,14	U
G/G	T/delT	A/A	1,14	U

E: extensivo; U: ultrarrápido.

Fenotipo posible		
Metabolizador (M)	n=88	%
Ultrarrápido (U)	33	37,51
Extensivo (E)	55	62,49
Intermedio (I)	0	0,00
Lento (L)	0	0,00

6. DISCUSIÓN

Los fenotipos de metabolismo de xenobióticos que un individuo exhiba pueden influir o no en la tolerancia que éste posea por cierta molécula o familia de éstas, y la importancia que estas variantes tengan en el individuo siempre va a estar relacionada con la posibilidad de que ocurra una reacción no deseada producto del contacto con estas. Así ocurre con los alimentos o alergias específicas, que resultan ser el parámetro más claro y visible de la variabilidad genética en la población. A distinto nivel, pero de igual manera, ocurre con los fármacos de uso terapéutico, los cuales pueden generar reacciones adversas inesperadas que afecten la seguridad del paciente llegando incluso a poner en peligro la vida de este, tomando en consideración adicional todas las consecuencias posibles que un tratamiento fallido causa a nivel institucional, social y económico en el paciente y su entorno. Es a este nivel que el tener herramientas en apoyo de la selección del fármaco más idóneo, en posología e intervalo de dosificación ideales, en vía de administración más conveniente y sus posibles interacciones con otros fármacos, procesos patológicos y fisiológicos; ayudarían a predecir los efectos que un fármaco pueda ocasionar en un individuo dado, permitiendo generar terapias con mayor beneficio y eficacia, con menor grado de inconvenientes para el paciente.

La población de estudio en esta investigación pertenece a pacientes del Hospital el Salvador de Valparaíso por utilizar terapias con diversos fármacos neuromoduladores. Si bien con esta condición existen varios citocromos implicados como metabolizadores de neurolépticos, antidepresivos, agentes coadyuvantes en hospitalizaciones y estados críticos; se decidió enfocar el estudio en pacientes que ya tuviesen evidencia previa de una posible presencia de polimorfismos genéticos que haya derivado en la falla de tratamiento a la terapia tradicional de primera línea y que incluso en la terapia actual existiera un riesgo de ineficiencia o rechazo al medicamento por manifestación de reacciones adversas severas, principalmente por incremento del fármaco o sus metabolitos en la sangre. Es por esto que se dedicó la investigación a pacientes con diagnóstico de esquizofrenia refractaria en actual tratamiento con clozapina. Se consideró la ruta metabólica de este fármaco para plantear la implicancia del CYP1A2 como factor significativo de la respuesta clínica a la terapia a este fármaco. Dentro de las múltiples variantes que se han descrito para este citocromo, se consideró de importante interés clínico los polimorfismos *1C, *1D y *1F que definen metabolismos ultrarrápido (Sachse et al., 2003; S.-F. Zhou et al., 2009). De igual manera se pretendió desde un inicio lograr integrar y cotejar estos mismos polimorfismos con otros fármacos para los que también pudieran tener significancia a nivel metabólico y terapéutico.

La farmacogenética trabaja con señales analíticas y métodos cuyos resultados son muy dependientes de la calidad de la muestra, tipo de ensayo y especificaciones de protocolo empleado. Estas metodologías aplican

un análisis cualitativo que se puede validar por técnicas de secuenciación de alta precisión. Esto último es lo que permitirá integrar estos protocolos a cualquier laboratorio clínico que implemente áreas de biología molecular y servir así como un complemento para realizar una terapia integrada y personalizada a los pacientes de cualquier centro de salud del país, donde se requiera.

6.1. Procedimiento de análisis por biología molecular.

El estudio de la variabilidad en la respuesta a fármacos mediante la caracterización de polimorfismos genéticos, ha sido una herramienta que se ha perfeccionado con los años hasta el punto de ser un examen con real posibilidad de ser ejercido en diversos hospitales del país, así como un análisis con características de poseer una alta sensibilidad y especificidad, ser análisis robustos y de bajos costos, dado por las características propias de la técnica de PCR convencional (Katsanis & Katsanis, 2013). Aun así es importante señalar que por más estandarizada que se encuentre la técnica, no está libre de errores técnicos o humanos, o de interpretación (Bakker, 2006). Esto cobra real importancia ya que permite comprender que los márgenes de error para esta técnica, si es que los hubieran, corresponderían a errores del tipo pre-analítico o post-analíticos.

De los problemas pre-analíticos ocurridos durante esta tesis, destacan el número de muestras que no fueron capaces de ser procesadas por poseer un nivel insuficiente de ADN ($n=15$, $[ADNg] \leq 5,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$), y que no arrojaron una señal suficiente a la hora de ser amplificados por PCR bajo las condiciones experimentales establecidas. Por otro lado, las muestras analizables, mostraron rangos de pureza y concentración de ácidos nucleicos aceptables ($n=88$; $260/280=1,7$; $260/230=1,5$; $[ADNg]=22,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$), los cuales se reflejan satisfactoriamente en el gel de integridad de ADN revelado, sin contar con interferencia de ARN o sin señales de degradación importante de ADN. Así mismo, es importante destacar que las muestras fueron almacenadas a -20°C por un periodo máximo de 6 meses, luego de su recolección en el Hospital del Salvador de Valparaíso, lo que en parte justifica el bajo promedio de concentración de ADNg extraído de las muestras debido a eventuales hemólisis que hubieran degradado y reducido la cantidad de núcleos de leucocitos presentes en las muestras. Esto se reflejó especialmente en la primera muestra ingresada como PC01, la cual contaba con una $[ADNg]$ equivalente a $1,9 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Estos resultados pueden estar relacionados con la existencia de otros factores capaces de generar interferencia en el proceso de termociclado, generando ausencia de señal, e incluso llegar a manifestar falsos negativos durante la amplificación. A este grupo heterogéneo de sustancias y condiciones se les denomina inhibidores de la polimerasa, y pueden corresponder desde altas concentraciones de calcio, urea, fenol, etanol, heparina, polisacáridos y proteínas tales como colágeno, mioglobina, hemoglobina, lactoferrina, IgG y proteinasas; dependiendo todos estos de las concentraciones presentes en la muestra a termociclar (Schrader, Schielke, Ellerbroek, & John, 2012).

Para el desarrollo de las técnicas de biología molecular se efectuó un ajuste empírico al modificar distintas constantes del proceso de PCR, principalmente temperatura de alineamiento, cantidad de nanogramos de ADN empleado y relación entre ADN presente y cantidad de partidores *forward* y *reverse* empleados; hasta llegar a los protocolos empleados para el análisis de los polimorfismos *1C, *1D y *1F para gen CYP1A2. Se validaron las técnicas de PCR y electroforesis en gel de agarosa, mediante la secuenciación de nucleótidos, reconocida como el método *gold standard* para la identificación de genes o fragmentos de estos (Bakker, 2006). En este caso, los resultados analizados por secuenciación para los SNPs, *1C y *1F, arrojaron resultados congruentes con los obtenidos desde la base de datos de SNPs del sitio de internet del NCBI con una similitud exacta (NCBI & NHGRI, 2010), permitiendo identificar satisfactoriamente la presencia de los polimorfismos buscados en dichas secuencias. Por otro lado, es posible validar la secuencia para el segmento genético que rodea al SNP *1D, mas no es posible validar la presencia del SNP en su totalidad. Esto último debido a presentar una desviación del marco de lectura importante en los fragmentos secuenciados que impiden identificar sin lugar a duda la presencia del polimorfismo buscado (Anexo 3). Es posible interpretar esta imprevista desviación del marco de lectura por la presencia del polimorfismo rs1040947059 (delTATC>TATC) (NCBI & NHGRI, 2010), que se manifiesta de manera frecuente en la población, y se define por delección de cuatro nucleótidos seguidos; esto significaría que en el caso de las secuenciaciones obtenidas, estos pacientes podrían corresponder a individuos heterocigotos para este último polimorfismo. Cabe destacar que no existe literatura o fuentes adicionales que hayan estudiado este polimorfismo, por lo que se entiende que su incorporación a la base de datos del genoma humano ha de ser reciente. Para determinar la causa exacta de esta interferencia en la lectura de la secuencia, más secuenciaciones del mismo polimorfismo deberían efectuarse hasta conseguir una lectura limpia de la cromatografía de nucleótidos correspondientes para un homocigoto salvaje u homocigoto para la variante que no perjudicara la secuenciación, y así descartar interferencias de otro tipo o contaminación de la muestra secuenciada. Por otro lado, también se definieron criterios de límite de detección para la exitosa ejecución del protocolo elaborado, así como para un satisfactorio resultado a esperar luego de aplicar la endonucleasa al producto de PCR obtenido. De esta manera se establecen cantidades mínimas de ADNg, de 0,01ng para la variante *1C; 0,1ng para *1D; y 0,01ng para el SNP *1F.

Los parámetros de protocolo para el desarrollo de RFLP para los productos de PCR fueron determinados empíricamente mediante el manejo de variables tales como volumen de producto de PCR, cantidad de unidades de enzima agregadas y tiempo de incubación óptimo. Las frecuencias, obtenidas por RFLP-PCR, para la presencia de los SNP específicos en la población diagnosticada con esquizofrenia refractaria, están expuestos en la tabla 5.1 como frecuencias alélicas de las variantes. Mediante el análisis comparativo

bibliográfica de las frecuencias alélicas variantes con las halladas en población demográficamente significativa para la población chilena, fue posible obtener los resultados indicados en el anexo 4. Las frecuencias alélicas obtenidas para *1C ($A^{-3860}=32,95\%$) correlacionan con las frecuencias esperadas en población americana ($p=0,337$) y de yoruba, Nigeria ($p=0,912$), por lo cual no sería posible establecer una correlación SNP y actividad metabólica por falta de estudios que correlacionen fenotipo sobre genotipo en pacientes de genotipo americano. Para la variante *1D, la frecuencia alélica ($\Delta T^{-2464}=36,93\%$), se encontró una similitud significativa con los resultados obtenidos de poblaciones peruana ($p=0,084$) y japonesa ($p=0,342$), donde está bien establecida la repercusión metabólica de la presencia homocigota de este SNP en el metabolismo de la cafeína (Bageman et al., 2008; Facheris et al., 2008; Sachse et al., 2003), estableciéndose en predominio un metabolismo rápido. Finalmente, para el polimorfismo *1F, las frecuencias obtenidas ($A^{-167}=71,59\%$), coincide con la mayoría de los estudios genéticos que establecen la dominancia del alelo A por sobre el C; que, aunque muchos estudios se prefieren la denominación -163A>C por encontrarse A>50% de la población, se prefiere denotar al alelo C como el salvaje por carecer de un impacto sobre la actividad metabólica o inducción del gen para CYP1A2. Así mismo, el SNP *1F, coincide en frecuencia con las halladas en poblaciones caucásicas (británicas, $p=0,749$; españoles, $p=0,112$; e italianos, $p=0,05$) y de Yoruba, Nigeria ($p=0,719$). Estos resultados coinciden con las prevalencias poblacionales de ascendencia genética presentes en la región de Valparaíso. De estos cabe destacar que todas las frecuencias genotípicas para los SNPs se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$, en los tres SNPs).

Durante el análisis de resultados fue posible visualizar la presencia de más de un SNP por fenotipo teórico, presentándose hasta cinco SNP en uno de los individuos de la población, lo cual señala un desequilibrio de los polimorfismos de CYP1A2 o bien, dado que los estudios genéticos de SNP en su mayoría son efectuados considerando un SNP y su relación a cierta manifestación fenotípica, es posible que la nomenclatura actual en la que se define un haplotipo por la presencia de un único polimorfismo esté errado. Estudios similares de análisis de múltiples SNP también señalan el mismo hallazgo en caucásicos británicos (Sachse et al., 2003). Esto se explica por lo que a nivel científico se ha propuesto el concepto de *allelic costelation* o constelación alélica en español, bajo la cual se define a un haplotipo por más de un SNP presente en el gen. Con relación a esto es que se encontraron cuatro genotipos que coinciden con la nomenclatura de genotipo salvaje (CYP1A2*1A; 5,68%), heterocigoto CYP1A2*1F (21,59%), heterocigoto CYP1A2 *1F/*1D (5,68%) y homocigoto CYP1A2*1F (11,36%) (Tabla 5.2). El resto de los genotipos obtenidos (56,00%) posee más de dos heterocigotos para las variantes o bien homocigoto para una de las variantes y heterocigoto para alguna de las otras, y componen otros 8 haplotipos diferentes a la nomenclatura tradicional para el gen CYP1A2 (Sim, 2010) (Tabla 5.3). Sobre la base de estos datos, fue posible plantear posibles fenotipos en base a referencias bibliográficas que plantean la presencia de homocigotos de cualquier variante con una alteración significativa de la

inducibilidad de la expresión del gen CYP1A2. Es por esto que se presta particular atención a los pacientes con genotipos que presenten A/A⁻³⁸⁶⁰, delT/delT⁻²⁴⁶⁴, o A/A⁻¹⁶⁷; obteniéndose un 37,51% de los pacientes posiblemente categorizados como metabolizadores ultrarrápidos y un 62,49% de pacientes que serían metabolizadores extensivos (Tabla 5.4), los cuales debiesen responder satisfactoriamente a una terapia estándar con clozapina, manteniendo concentraciones plasmáticas dentro de la normalidad según dosis administrada. El conocimiento de este factor genético sobre el metabolismo y su impacto sobre la respuesta a la terapia, permite emplear estrategias que aseguren la eficacia de la misma, ya sea comenzando la titulación con dosis más elevadas, para los pacientes categorizados como MU y sometidos a un inductor enzimático (Tabla 1.2); la administración conjunta con dosis bajas de alguno de los inhibidores para CYP1A2, que permitan trabajar con dosis menores de fármaco; o sencillamente optar de inmediato por una combinación de neurolépticos que permitan establecer una mejoría con el menor riesgo y pérdida de tiempo en el paciente.

De esta manera, el conocimiento genotípico del CYP1A2 considera una precaución clínica para los pacientes sometidos a terapias con fármacos que sean importantemente metabolizados por este algunos presentados ya en la tabla 1.2, tales como neurolépticos de primera (tioridazina) y segunda generación (clozapina y olanzapina), antiparkinsonianos (ripinirol), broncodilatadores (teofilina), analgésicos (aminopirina), AINEs (nabumetona), relajantes musculares (tizanidina), agentes antirreumáticos (leflunomida), antiplaquetarios (del tipo zolmitriptan), inductores del sueño (melatonina), antihipertensivos (propranolol, verapamilo), antidepresivos (duloxetina) y anestésicos de bloqueo epidural (ropivacaína) vigentes en el registro sanitario de Chile (ANAMED, 2017; S.-F. Zhou et al., 2009); teniendo como principal consideración evitar la exposición del paciente a tabaco, hidrocarburos aromáticos policíclicos o a fármacos como fenitoína, fenobarbital, omeprazol, carbamazepina, ritonavir, rifampicina (Zanger & Schwab, 2013; S.-F. Zhou et al., 2009). Así mismo se ha establecido la participación de los SNP del CYP1A2 asociados principalmente a los fenotipos MU y ML, como predictores de riesgo carcinogénico general. CYP1A2 es responsable del metabolismo y bioactivación a metabolitos carcinogénicos tal como ocurre para moléculas como el estragol, hidrocarburos aromáticos policíclicos y micotoxinas (S. Zhou et al., 2009; S.-F. Zhou et al., 2009), siendo mal pronóstico la presencia de un genotipo MU para estos pacientes. Aun así esto no responde a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mamas, ya que CYP1A2 metaboliza estradiol generando un metabolito antagonista de los receptores estrogénicos, lo cual, en pacientes MU, contribuiría a reducir el riesgo de esta patología (Bageman et al., 2008; Sachse et al., 2003).

Aun así, es importante destacar que las tecnologías y comprensión actual del genoma no permiten generar recomendaciones tajantes, sino que hasta el momento sirven como pauta para agilizar y dar a lugar protocolos más personalizados para la terapia en cualquier ámbito de la salud. El pilar fundamental para el desarrollo de

una medicina personalizada de alta precisión se encuentra en la capacidad de integrar distintas disciplinas clínicas a favor de mejorar la calidad de terapia recibida por los distintos pacientes. En este aspecto el laboratorio clínico, con la aplicación de distintas técnicas analíticas, forma una herramienta de múltiples posibilidades, especialmente si es dirigida por un profesional capacitado para aprovechar todo su potencial.

7. CONCLUSIONES

- El análisis por PCR-RFLP para la determinación de los SNP del gen CYP1A2 para las variantes de transición, *1C (-3860G>A), y transversión, *1F (-163C>A), se considera validado, por lo que permite determinar inequívocamente los genotipos homocigoto salvaje, heterocigoto y homocigoto para estas variantes.
- La metodología para determinar el SNP *1D (-2464T>delT) del gen CYP1A2 fue estandarizada acorde a las tecnologías vigentes para este estudio, pero no validada por secuenciación, por consiguiente, estos genotipos se consideran probables.
- Por observar la presencia de más de dos SNP simultáneamente en los genotipos obtenidos, no es posible determinar haplotipos clásicos del gen CYP1A2 en todos los pacientes.
- Se logró determinar en los pacientes integrados en este estudio las variantes metabólicas probables según genotipo, clasificando a estos en metabolizadores ultrarrápidos y extensivos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Nacional del Medicamento (ANAMED), Instituto de Salud Pública (ISP), Gobierno de Chile. (2017). Registro sanitario de productos farmacéuticos de uso humano. Recuperado 28 de agosto de 2017, a partir de registrosanitario.ispch.gob.cl
- Armijo, J. (2014). Farmacocinética: absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En J. Flórez, J. Armijo, & A. Mediavilla (Eds.), *Farmacología Humana* (6ª Ed., pp. 46–71). Barcelona, España: Elsevier Masson.
- Bageman, E., Ingvar, C., Rose, C., & Jernström, H. (2008). Coffee Consumption and CYP1A2*1F Genotype Modify Age at Breast Cancer Diagnosis and Estrogen Receptor Status. *American Association for Cancer Research*, *17*(4), 895–901.
- Bakker, E. (2006). Is the DNA Sequence the Gold Standard in Genetic Testing? Quality of Molecular Genetic Tests Assessed. *Clinical Chemistry*, *52*(4), 2004–2005.
- Beutler, E., Dern, T., & Alving, A. (1955). The hemolytic effect of primaquine. VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. *J Lab Clin Med*, *45*, 40–50.
- Blumenthal, D., & Garrison, J. (2012). Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. En L. Brunton, B. Chabner, & B. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12ª Ed., pp. 41–72). New York, USA: McGraw-Hill.
- Bobes, J., & González, M. (2000). Calidad de vida en la esquizofrenia. En H. Katsching, H. Freeman, & N. Sartorius (Eds.), *Calidad de vida en los trastornos mentales* (pp. 157–169). Barcelona, España: Editorial Masson.
- Calvo, M., García, M., Martínez, J., & Fernández, M. (2002). Farmacocinética clínica. En M. Gamundi & J. Bonal (Eds.), *Farmacia Hospitalaria. Tomo I* (3ª Ed., pp. 625–665). Madrid, España: Fundación Española de Farmacia Hospitalaria.
- Crismon, L., Argo, T., & Buckley, P. (2014). Schizophrenia. En J. DiPiro, R. Talbert, G. Yee, & E. Al (Eds.), *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. (9th ed., pp. 1019–1046). New York, USA: McGraw-Hill.
- De Leon, J. (2009). The Future of Personalized Prescription in Psychiatry. *Pharmacol Res*, *25*, 118–134.
- Eap, C., Bender, S., & Jaquenoud Sirot, E. (2004). Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene. *J Clin Psychopharmacol.*, *24*, 214–229.
- Facheris, M., Schneider, N., Lesnick, T., De Andrade, M., Cunningham, J., Rocca, W., & Maraganore, D. (2008).

- Coffee, caffeine-related genes, and parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord*, 23(Octubre), 2033–2040.
- Farde, L., Nordstrom, A., Wiesel, F., Pauli, S., Halldin, C., & Sedvall, G. (1992). Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry*, 49, 538–544.
- Fuentes, M., Pulgar, I., Gallo, C., Bartolini, M.-C., Canizales-Quinteros, S., Bedoya, G., Rothhammer, F. (2014). Geografía génica de Chile. Distribución regional de los aportes genéticos americanos, europeos y africanos. *Rev. Med. Chile*, 142, 281–289.
- Hiemke, C., & Shams, M. (2013). Phenotyping and genotyping of drug metabolism to guide pharmacotherapy in psychiatry. *Curr Drug Deliv*, 10, 46–53.
- Hines, R. (2007). Ontogeny of human hepatic cytochromes P450. *J Biochem Mol Toxicol*, 21, 168–175.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H., Brockmöller, J., John, A., Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3473–3478.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphism on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 116, 496–526.
- Katsanis, S., & Katsanis, N. (2013). Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet*, 14(6), 415–426.
- Kim, D., Maneen, M., & Stahl, S. (2009). Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia. *Neurotherapeutics*, 6, 78–85.
- Kootstra-Ros, J. E., Smallegoor, W., & Van Der Weide, J. Van Der. (2005). The cytochrome P 450 CYP1A2 genetic polymorphisms *1F and *1D do not affect clozapine clearance in a group of schizophrenic patients. *Ann Clin Biochem*, 42, 216–219.
- Lavretsky, H. (2008). History of Schizophrenia as a Psychiatric Disorder. En T. Kim, K. Mueser, & D. Jeste (Eds.), *Clinical Handbook of Schizophrenia* (pp. 3–12). New York, USA: Guilford Press.
- Lieberman, J. (1999). Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and pathophysiological perspective. *Biol Psychiatry*, 46, 729–739.
- Lieberman, J., Jody, D., & Geisler, S. (1993). Time course and biologic correlates of treatment response in first-

- episode schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 50, 369–376.
- Martínez-Cue, C., & Flórez, J. (2014). Fármacos antipsicóticos neurolépticos. En J. Flórez, J. Armijo, & A. Mediavilla (Eds.), *Farmacología Humana* (6ª Ed., pp. 519–532). Barcelona, España: Elsevier Masson.
- McGrath, J., Saha, S., Welham, J., Saadi, O. El, MacCauley, C., & Chant, D. (2004). A systematic review of the incidence of schizophrenia : the distribution of rates and the influence of sex , urbanicity , migrant status and methodology. *BMC Medicine*, 22, 1–22.
- Meyer, U. (2004). Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev*, 5, 697–704.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2009). Guía Clínica PARA EL TRATAMIENTO DE PERSONAS DESDE PRIMER EPISODIO DE ESQUIZOFRENIA. (*Serie guías clínicas MINSAL*, pp. 1-99) Santiago, Chile.
- Mitchell, P. B. (2001). Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol*, 52, 45S–54S.
- Miyamoto, S., Miyake, N., Jarskog, L., Fleischhacker, W., & Lieberman, J. A. (2012). Pharmacological treatment of schizophrenia : a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1206–1227.
- Mrazek, D. A. (2010). The cytochrome P450 1A2 gene. En D. A. Mrazek (Ed.), *Psychiatric Pharmacogenomics* (1ª Ed., pp. 83–98). New York, USA: Oxford University Press, Inc.
- Mukherjee, K., Twyman, R., & Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(1-2), 69–78.
- Nakajima, M., Tsuyoshi, Y., Mizutani, M., Kinoshita, M., Funayama, M., & Kamataki, T. (1999). Genetic Polymorphism in the 5' -Flanking Region of Human in Humans1 CYP1A2 Gene : Effect on the CYP1A2 Inducibility in Humans. *J. Biochem*, 125(4), 803–808.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), & National Human Genome Research Institute (NHGRI). (2010). The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Single Nucleotide Polymorphisms Database (dbSNP). Recuperado 19 de julio de 2017, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- Nature Publishing Group (NPG). (2014). Scitable Glossary/Index. Recuperado 14 de agosto de 2017, a partir de <https://www.nature.com/scitable/glossary>
- Ozdemir, V., Kalow, W., & Okey, A. (2001). Treatment-resistance to clozapine in association with ultrarapid

- CYP1A2 activity and the C>A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene: effect of grapefruit juice and low-dosefluvoxamine. *J Clin Psychopharmacol.*, 21, 603–607.
- Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K., & Atkinson, D. (2014). Schizophrenia : Overview and Treatment Options. *Pharmacy and Therapeutics*, 39(9), 638–645.
- Pavanello, S., Mastrangelo, G., Placidi, D., Campagna, M., Pulliero, A., Carta, A., ... Porru, S. (2010). CYP1A2 polymorphisms , occupational and environmental exposures and risk of bladder cancer. *European Journal of Epidemiology*, (25), 491–500.
- Peng, L., Yoo, B., Gunewardena, S., Lu, H., Klaassen, C., & Zhong, X.-B. (2012). RNA-sequencing reveals dynamic changes of mRNA abundance of cytochromes P450 and their alternative transcripts during mouse liver development. *Drug Metabolism and Disposition*, 40, 1198–1209.
- Pinazo-Durán, M. D. (2012). Genética y algo más. *Arch. Soc. Española de Oftalmología*, 87(2), 35–37.
- Remington, G., & Kapur, S. (1999). D2 and 5-HT₂ receptor effects of antipsychotics: bridging basic and clinical findings using PET. *J Clin Psychiatry*, 60(10), 15–19.
- Roden, D. M., & George, A. L. (2002). THE GENETIC BASIS OF VARIABILITY IN DRUG RESPONSES. *Nat Rev Drug Discovery*, 1(January), 37–44.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S., Kakol, J., Stein, L., Marth, G., ... Altshuler, D. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409, 928–933.
- Sachse, C., Bhambra, U., Smith, G., Lightfoot, T. J., Barrett, J. H., Scollay, J., ... Gooderham, N. J. (2003). Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies , linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol*, 55, 68–76.
- Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., & Roots, I. (1999). Functional significance of a C>A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol*, 47, 445–449.
- Sánchez, I., Amador, C., Plaza, J., Correa, G., & Amador, R. (2014). Impacto clínico de un sistema de farmacovigilancia realizado por un farmacéutico en el reporte y subnotificación de reacciones adversas a medicamentos. *Rev. Med. Chile*, 142, 998–1005.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J of Applied Microbiology*, 113, 1014–1026. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

- Schwartz, J., & Javitch, J. (2013). Neurotransmitters. En E. Kandel, J. Schwartz, & T. Jessell (Eds.), *Principles of Neural Science* (5ª Ed., pp. 289–305). New York, USA: McGraw-Hill.
- Sim, S. C. (2010). Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Recuperado 24 de noviembre de 2016, a partir de <http://www.cypalleles.ki.se>
- Siok, J., Im, L. L., Ingh, O. S., Amasamy, R. D. R., Amasamy, S. R., Ubramanian, K. S., ... Howbay, B. C. (2010). Pharmacogenetics of CYP1A2, Novel Polymorphisms and Haplotypes in Three Distinct Asian Populations. *Drug Metab Pharmacokinet*, 25(6), 616–623.
- Spina, E., & de Leon, J. (2015). Clinical applications of CYP genotyping in psychiatry. *J Neural Transm*, 122, 5–28.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., ... Wanker, E. E. (2005). A Human Protein-Protein Interaction Network: A Resource for Annotating the Proteome. *Cell*, 122, 957–968.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (s. f.). Overview of purification process. Waltham, Massachusetts, USA.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Reaction Conditions for Restriction Enzymes. Recuperado 3 de diciembre de 2016, a partir de <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/conventional-restriction-enzymes-thermo-scientific/reaction-conditions-for-restriction-enzymes.html>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). *Thermo Scientific GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit* (Vol. No. MAN001). Waltham, Massachusetts, USA.
- Tracy, T. S., Chaudhry, A. S., Prasad, B., Thummel, K. E., Schuetz, E. G., Zhong, X., ... Lin, Y. S. (2016). Interindividual Variability in Cytochrome P450–Mediated Drug Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(March), 343–351.
- Turner, R. M., Park, B. K., & Pirmohamed, M. (2015). Parsing interindividual drug variability: an emerging role for systems pharmacology. *Wiley Interdiscip Rev System Biology and Medicine*, 7(August), 221–241.
- Vicente P, B., Rioseco S, P., Saldivia B, S., Khon, R., & Torres P, S. (2002). Estudio chileno de prevalencia de patología psiquiátrica (DSM-III-R/CIDI) (ECPP). *Rev Méd Chile*, 130, 527–536.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138, 103–141.

Zhou, S., Liu, J., & Chowbay, B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*, *41*, 89–295.

Zhou, S.-F., Yang, L.-P., Zhou, Z.-W., Liu, Y.-H., & Chan, E. (2009). Insights into the Substrate Specificity, Inhibitors, Regulation, and Polymorphisms and the Clinical Impact of Human Cytochrome P450 1A2. *AAPS Journal*, *11*(3), 481–494.

9. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado. Hoja 1.

Consentimiento Informado para Estudio Genético: Identificación de Biomarcadores Asociados a Síntomas Psicóticos Refractarios en Personas Enfermas de Esquizofrenia

Usted está siendo invitado, por presentar un diagnóstico de esquizofrenia a participar en forma anónima y voluntaria, en una investigación para identificar factores genéticos asociados a la falta de respuesta a los fármacos para la esquizofrenia. Antes de participar es necesario que comprenda la siguiente información respecto de su propósito y procedimientos. Si tiene dudas, consulte con el médico investigador, Dr. Alvaro Cavieres (322508550, lunes a viernes de 9:00 a 17:00) y con algún familiar

INFORMACION PARA EL PARTICIPANTE

Algunas personas con esquizofrenia no responden adecuadamente a los medicamentos para tratar los síntomas psicóticos. Se piensa que esto puede deberse a las distintas maneras en que el organismo reacciona con los medicamentos. Es posible que esto se deba a diferencias genéticas que podrían ser estudiadas, a través de un examen de sangre. Esta investigación busca identificar marcadores genéticos presentes en personas resistentes al tratamiento para la esquizofrenia, en nuestra población.

Procedimientos del estudio

Una vez que usted lea este consentimiento y acepte participar, se le hará firmar este documento, o en compañía de un familiar (si corresponde). Los procedimientos son:

- Entrevistas con un psiquiatra para evaluar sus síntomas (45 minutos).
- Toma de una muestra de 20 ml. de sangre (aproximadamente una cucharada)

Adicionalmente al firmar este consentimiento usted estará también autorizando a los investigadores para revisar su ficha clínica.

Información acerca de las Pruebas

Usted recibirá toda la información disponible acerca de los resultados de las pruebas realizadas. La información que no sea de utilidad para su atención médica no será compartida, a menos que sea requerida por alguna autoridad.

Beneficios

Si usted participa en este estudio **podría** beneficiarse al tener más información acerca de como los medicamentos funcionan en su cuerpo. Esto **podría** determinar algún cambio en su tratamiento.

Riesgos

Los riesgos de este estudio son similares a los de la toma de muestra de sangre, para su hemograma mensual. Puede tener sensación de desmayo, dolor leve, irritación o enrojecimiento de la zona. En muy raros casos, puede haber infección.

Manejo de las muestras

Las muestras serán transportadas y almacenadas siguiendo las normas de bioseguridad del laboratorio de análisis de la Universidad de Valparaíso. A su muestra se le asignará un código y será almacenada en un lugar con llave por un máximo de dos años, desde la finalización del estudio. Después de ese plazo, las muestras serán destruidas. Si se decide utilizar las muestras para un estudio diferente, se solicitará nuevamente su autorización.

Responsabilidades del Participante

Su responsabilidad consiste en entregar de manera clara la información que se le solicita, aceptar las mediciones y asistir a todos los controles y cumplir con las indicaciones.

Alternativas

Usted tiene la alternativa de no participar en esta investigación, sin que esto afecte su tratamiento, siendo libre en la toma de decisión y si en algún momento desea dejar de participar, también es libre de hacerlo.

Confidencialidad

Los datos acá obtenidos son totalmente anónimos, solo se presentan en número de casos, pero se guarda la confidencialidad de los participantes. Sólo el investigador y sus colaboradores sabrán que usted está participando en él. Los registros serán identificados con un código y no con el nombre. Si los resultados de este estudio son publicados, usted no será identificado por el nombre.

Retribución Económica

No se cancelará dinero por participar en la Investigación, ni para traslado, ni colación. En el caso de ser especialmente citado para la investigación, el estudio tendrá costos para usted asociados a su traslado

Anexo 1.1: Consentimiento Informado. Hoja 2.

Consentimiento Informado para Estudio Genético: Identificación de Biomarcadores Asociados a Síntomas Psicóticos Refractarios en Personas Enfermas de Esquizofrenia

Yo,....., CI....., he leído este documento y recibido suficiente información. He tenido oportunidad de efectuar preguntas y recibido respuestas satisfactorias. Entiendo que mi participación es voluntaria y que puedo abandonar el estudio cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que ello afecte mis atenciones médicas.

Entiendo que estoy protegido por lo establecido en la Ley 20120 sobre Investigación en el Ser Humano, Decreto 114 y Decreto 30 sobre el reglamento de esa misma Ley y por la Ley 20.584 sobre Derechos de los Pacientes.

Este estudio de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité Ético Científico del SSVSA e indicar al participante que ante cualquier duda, puede ponerse en contacto con el Presidente del CEC, Dr. Rodrigo Vergara Fisher (2576581) y/o con los Investigadores Dr. Álvaro Cavieres (2508550) y/o Maximiliano Abarca

También he sido informado de forma clara, precisa y suficiente, del manejo de los datos personales que se contienen en este consentimiento e involucrados en esta investigación: estos serán tratados y custodiados con respeto, privacidad y protección según la normativa vigente, Ley 19.628.

Declaro que he leído y conozco el contenido de este documento, comprendo los compromisos que asumo y los acepto expresamente. Y, por ello, firmo este consentimiento informado, de forma voluntaria para manifestar mi deseo de participar en el estudio: "INVESTIGACION DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ANTIPSICOTICOS EN LA ESQUIZOFRENIA", hasta que decida lo contrario.

Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos.

Recibiré una copia de este consentimiento para guardarlo y consultarlo en el futuro.

PARTICIPANTE:

Fecha de Firma _____

FAMILIAR O TUTOR LEGAL:

Fecha de Firma _____

MÉDICO INVESTIGADOR:

Fecha de Firma _____

DIRECTOR DEL HOSPITAL

Fecha de Firma _____

Anexo 2: Aprobación Comité de Ética.



APROBACIÓN DE DOCUMENTOS

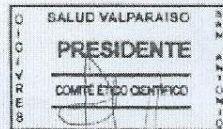
El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Valparaíso San Antonio, presidido por el Dr. Rodrigo Vergara Fisher, certifica haber recibido, evaluado y aprobado Proyecto: "Identificación de biomarcadores asociados a síntomas psicóticos refractarios en personas enfermas de esquizofrenia", con fecha 10 de Marzo del 2015.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: DR. ÁLVARO CAVIERES FERNÁNDEZ
SITIO DE INVESTIGACIÓN: HDS SERVICIO DE SALUD VALPARAISO SAN ANTONIO

Documentación Aprobada:

Protocolo de investigación "Identificación de biomarcadores asociados a síntomas psicóticos refractarios en personas enfermas de esquizofrenia"	APROBADO
Formulario de Consentimiento Informado Genético estudio "Identificación de biomarcadores asociados a síntomas psicóticos refractarios en personas enfermas de esquizofrenia"	APROBADO

Saluda atentamente a Usted,



DR. RODRIGO VERGARA FISHER
PRESIDENTE CEC
SERVICIO DE SALUD VALPARAÍSO-SAN ANTONIO

Anexo 3: Cromatogramas de secuenciación obtenidos de un mismo paciente para el polimorfismo CYP1A2*1D.

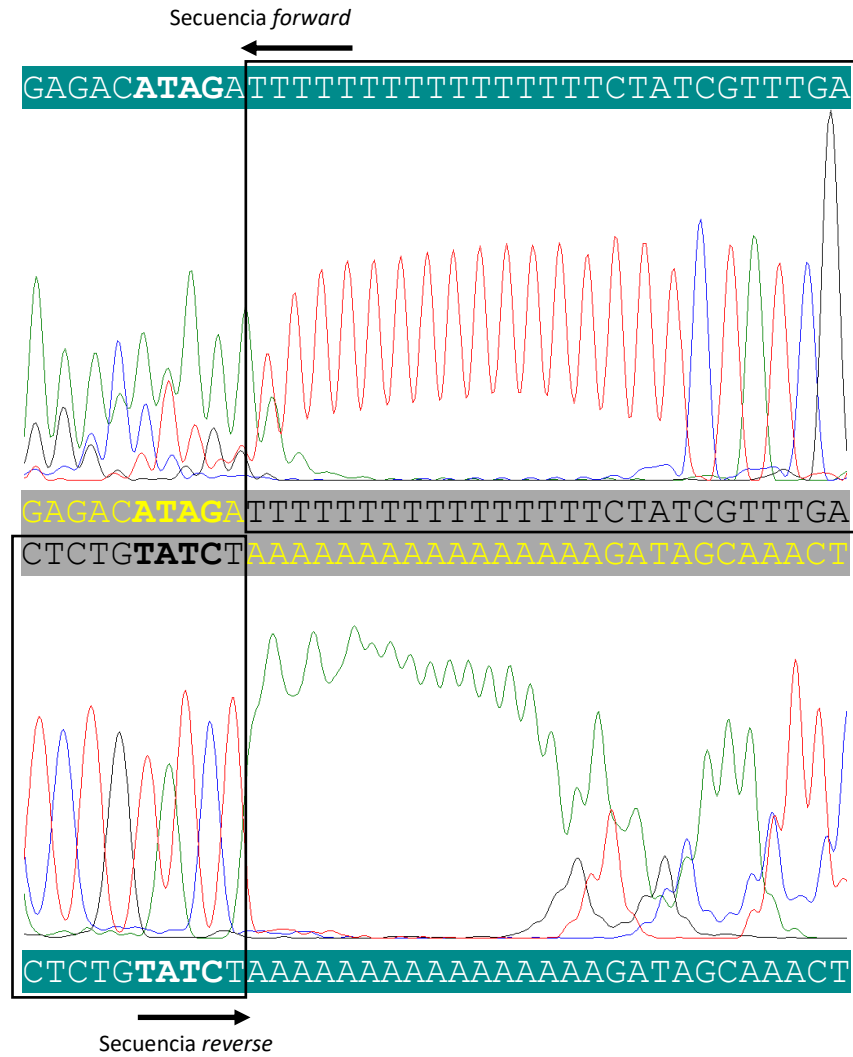


Figura 1. Cromatogramas de secuenciación para paciente en estudio para la variante -2464T>delT, señalando punto en el que ocurre un cambio en el marco de lectura de la secuencia. Las flechas indican la dirección en que se realizó la técnica. Las secuencias escritas en color azul corresponden a la secuencia teórica (NCBI & NHGRI, 2010), y la secuencia en color gris corresponde a la secuencia arrojada por el equipo, así mismo la demarcadas color amarillo indican los nucleótidos que fueron establecidos solo por complementariedad de bases entre ambas señales de secuenciación *forward* y *reverse*, y que no presentaban correlación según nucleótido teórico y señal analítica de manera directa. En letra más gruesa se indica la secuencia TATC, relacionada con el polimorfismo rs1040947059 (delTATC>TATC), posible origen del desplazamiento del marco de lectura detectado por el equipo Fuente: diseño propio.

Anexo 4. Tablas de frecuencia alélica y correlación con otras poblaciones.

Tabla 1.: Comparación de frecuencias alélicas obtenidas para las variantes y las presentes en distintas etnias relacionadas al genoma chileno.

Población	Frecuencia alélica (%)					
	-3860 G>A		-2464 T>delT		-163 C>A	
	G	A	T	delT	C	A
Caucásicos						
Británicos (n=182)	98,90	1,10	93,41	6,59	26,92	73,08
Españoles (n=214)	99,07	0,93	95,79	4,21	35,98	64,02
Italianos (n=214)	97,66	2,34	89,72	10,28	37,85	62,15
Americanos						
Peruanos (n=170)	31,76	68,24	53,91	46,09	13,53	86,47
Mexicanos (n=128)	61,72	38,28	25,29	74,71	26,56	73,44
Africanos						
Nigeria (n=216)	67,59	32,41	48,15	51,85	45,83	54,17
Asiáticos						
Japoneses (n=208)	76,92	23,08	60,58	41,67	39,90	60,10
Resultados (n=176)	67,05	32,95	63,07	36,93	28,41	71,59

Población	Concordancia según resultados					
	A (32,95%)		delT (36,93%)		A (71,59%)	
	Valor-z	Valor-p	Valor-z	Valor-p	Valor-z	Valor-p
Caucásicos						
Británicos	8,0663	0,0000	6,9851	0,0000	-0,3151	0,7490
Españoles	8,7224	0,0000	8,2004	0,0000	1,5875	0,1118
Italianos	8,1736	0,0000	6,2910	0,0000	1,9642	0,0500
Americanos						
Peruanos	-6,5634	0,0000	-1,7292	0,0836	-3,3914	0,0007
Mexicanos	-0,9607	0,3371	-6,5150	0,0000	-0,3561	0,7188
Africanos						
Nigeria	0,1134	0,9124	-2,9525	0,0318	3,5341	0,0004
Asiáticos						
Japoneses	2,1557	0,0308	-0,9467	0,3421	2,3578	0,0183