



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

---

# FRECUENCIA DE POLIMORFISMO GENÉTICO EN LOS ALELOS \*3 \*4 Y \*6 DEL CYP2D6 EN LA POBLACIÓN DE LA COMUNA DE VALPARAÍSO

---

Unidad de investigación para optar al título de Químico Farmacéutico

Alicia Caroline Junker Silva

Directora: Caroline Ruth Weinstein Oppenheimer, Ph.D.

2019

## Resumen

Existe una amplia gama de individuos que varía en su respuesta a los medicamentos desde no respondedores hasta respondedores a muy bajas dosis. Este fenómeno se atribuye principalmente a la variabilidad genética interindividual para blancos moleculares, entre los que destaca la superfamilia del citocromo P450. Entre estos representantes se encuentra CYP2D6, que metaboliza al 25% de los fármacos y además es altamente polimórfico lo cual afecta directamente en la farmacoterapéutica. El objetivo de esta unidad de investigación fue identificar la frecuencia, en habitantes de la comuna de Valparaíso, de polimorfismo de los alelos \*3, \*4 y \*6 del CYP2D6 cuya presencia provoca un metabolismo lento asociado a toxicidad potencial del medicamento. Para la determinación de la frecuencia alélica se muestrearon 104 voluntarios de la comuna de Valparaíso a los que se les tomó una muestra de hisopado bucal para extraer ADN, que se analizó mediante PCR simple o múltiple. Las frecuencias alélicas fueron 22,12% para \*3, 3,85% para \*4 y 0,96% para \*6. Estas frecuencias no coinciden con las descritas para población caucásica, lo que fundamenta la necesidad de seguir evaluando la frecuencia de estos polimorfismos en población chilena con el fin de contar con información que refleje la realidad local. El identificar la frecuencia de polimorfismos para representantes de esta familia, contribuiría a hacer medicina de precisión.

## Abstract

Frequency of genetic polymorphism in the alleles \* 3 \* 4 and \* 6 of the CYP2D6 in the population of the Valparaiso county

There is wide variety of people that varies on their response to drugs, from non-responders to responders at a very low dose. This phenomenon is mainly attributed to genetic variability for molecular targets, among which the cytochrome P450 superfamily highlights. CYP2D6 is one of the representatives of this family, that metabolizes 25% of the drugs and in addition is highly polymorphic, affecting directly the pharmacotherapeutics. The aim of this research unit was to identify the presence, within the Valparaíso county, of the CYP2D6 \*3, \*4 y \*6 alleles, that cause a poor metabolism associated to potential drug toxicity. To determine the allelic frequency, 104 volunteers from Valparaíso county were sampled by taking a buccal swab to extract ADN to be analyzed by simple and multiple PCR. The allelic frequencies were 22,12% for \*3, 3,85% for \*4 and 0,96% for \*6. These frequencies do not agree with the one described for Caucasians, which supports the need to continue evaluating these polymorphisms frequencies in the Chilean population in order to count with information that reflects the local reality. The identification of the frequency of polymorphisms for the representatives of this family would contribute to precision medicine.

## Definiciones

Farmacogenética: Ciencia que permite identificar las bases genéticas de las diferencias interindividuales en la respuesta a drogas. Estudia cómo los genes de un paciente pueden afectar a la respuesta que este presenta a un tratamiento farmacológico <sup>1,2</sup>.

Farmacogenómica: Ciencia que estudia la susceptibilidad de una persona a diversas enfermedades, con el fin de modificar factores como el estilo de vida. Estudia en su conjunto a todos los genes farmacológicamente relevante <sup>2,3</sup>.

# Índice

Índice de tablas .....	0
1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	9
2.1 General.....	9
2.2 Específicos.....	9
3. Materiales y métodos .....	10
3.1 Diseño experimental.....	10
3.2 Aspectos éticos .....	11
3.3 Características del estudio .....	11
3.4 Toma de muestras .....	12
3.5 Extracción de ADN .....	12
3.6 Detección de los genes y sus variantes.....	13
3.6.1 Detección del gen constitutivo .....	14
3.6.2 Detección de la variante CYP2D6*3:.....	14
3.6.3 Detección de variante CYP2D6*4: .....	14
3.6.4 Detección de la variante CYP2D6*6:.....	15
3.7 Análisis de los datos.....	16
4. Resultados.....	17
4.1 Análisis de amplificación por PCR (objetivo específico N°1).....	17
4.1.1 Calidad del ADN extraído .....	17
4.1.2 Integridad y capacidad de amplificación .....	17
4.1.3 Detección de la variante CYP2D6*3 .....	19
4.1.4 Detección de la variante CYP2D6*4 .....	21
4.1.5 Detección de la variante CYP2D6*6.....	23
4.2 Análisis de frecuencias (Objetivo específico N°2).....	25
5. Discusión .....	27
6. Conclusión.....	33
7. Bibliografía .....	34
8. Anexos.....	39
Anexo 1: Acta aprobación comité bioética .....	39

Anexo 2.1: Copia consentimiento informado para investigador .....	41
Anexo 2.2: copia de consentimiento informado para participante.....	42
Anexo 3: convenio de confidencialidad .....	43
Anexo 4: Mapa representativo de la localización de la toma de muestras en la comuna de Valparaíso .....	44
Anexo 5: afiche de difusión.....	45
Anexo 6: Composición gel poliacrilamida 5% .....	46
9. Reactivos y Equipos .....	47
9.1 Reactivos .....	47
9.2 Equipos.....	48

## Índice de Figuras

Figura 1: Fenotipos metabolizadores.....	2
Figura 2:Enzima CYP2D6 .....	3
Figura 3:Esquematización del diseño experimental .....	10
Figura 4:Esquema del procedimiento de extracción de ADN a partir de un hisopado bucal de BlackPREP Swap DNA kit. ....	13
Figura 5:Gel de integridad. ....	18
Figura 6:Gel Gen Constitutivo .....	18
Figura 7: Esquema PCR anidada de 1 paso para CYP2D6*3 Y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. ....	19
Figura 8: Gel variante CYP2D6*3.....	20
Figura 9 Esquema de la PCR anidada en dos pasos para CYP2D6*4 y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. ....	21
Figura 10 Gel de la variante CYP2D6*4. ....	22
Figura 11 Esquema de la PCR anidada en un paso PARA CYP2D6*6 y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. ....	23
Figura 12 Gel de la variante CYP2D6*6.....	24
Figura 13:Mapa representativo de la comuna de Valparaíso .....	44
Figura 14:Fórmula de cálculo de tamaño de muestra.....	28

## Índice de tablas

Tabla 1: Frecuencia de los polimorfismos en los alelos *3,*4 *5 *6 en los distintos grupos de poblaciones. ....	6
Tabla 2:Criterios de inclusión y exclusión .....	11
Tabla 3: Partidores utilizados en la determinación de las variantes polimórficas y en la evaluación del gen constitutivo. ....	16
Tabla 4:Evaluación cualitativa de volúmenes de buffer de elusión utilizados para la extracción de ADN.....	17
Tabla 5:Resultados de frecuencia alélica (n=208) .....	25
Tabla 6:Resultados de frecuencia genotípica para las variantes CYP*3, CYP2D6*4 y CYP2D6*6 (n=104).....	25
Tabla 7:Frecuencia de constelaciones alélicas entre 2 polimorfismos .....	26
Tabla 8:frecuencia de constelaciones alélicas entre los 3 polimorfismos .....	26

## 1. Introducción

Los fármacos son un pilar fundamental de la terapéutica; sin embargo, la respuesta evidenciada es de alta variabilidad, llegando a existir una amplia gama de sensibilidad, en un rango que va desde el éxito terapéutico hasta reacciones adversas que pueden llegar a ser fatales. Se ha reportado a nivel mundial que la proporción de pacientes que responde de manera favorable al primer fármaco prescrito es típicamente solo entre 50 a 75%; que aproximadamente 6,5% de las admisiones a los hospitales se relacionan a reacciones adversas a medicamentos (RAM); y que alrededor de 15% de los pacientes hospitalizados experimentan una RAM con la consecuente disminución en la calidad de vida y/o aumento del costo del tratamiento <sup>4-6</sup>. Esto se debe, en la mayoría de los casos, a una variabilidad interindividual que puede deberse a muchos factores, entre los cuales se destacan los polimorfismos genéticos que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos, como la superfamilia del citocromo P450 (CYP) <sup>7,8</sup>.

En humanos, el ejemplo más estudiado de polimorfismos genéticos relacionados con enzimas que actúan en la fase I del metabolismo de muchas sustancias endógenas y exógenas es el gen de CYP2D6. Este está localizado en el cromosoma 22 región 22q13.1 que codifica la enzima debrisoquina-4-hidroxilasa (CYP2D6), una de las enzimas más importantes que participan del metabolismo de fármacos que actúan tanto a nivel del sistema nervioso central (SNC) como del sistema circulatorio. Es un miembro altamente polimórfico de la familia CYP y se expresa principalmente en el hígado, es responsable del metabolismo del 25% de los fármacos y se ha demostrado, a través de distintos estudios de genotipificación masiva, que su variable actividad enzimática se presenta no sólo según la raza, sino que también en los distintos grupos étnicos de una misma raza <sup>8-11</sup>. Los polimorfismos en esta enzima generan que los individuos puedan ser clasificados en metabolizadores pobres (PM) (aquellos con una actividad disminuida), metabolizadores intermedios (poseen solo 1 alelo funcional), metabolizador extensivo (normal) y metabolizador ultrarrápido (UM) (poseen más de 2 alelos funcionales) (Figura 1) <sup>3</sup>.

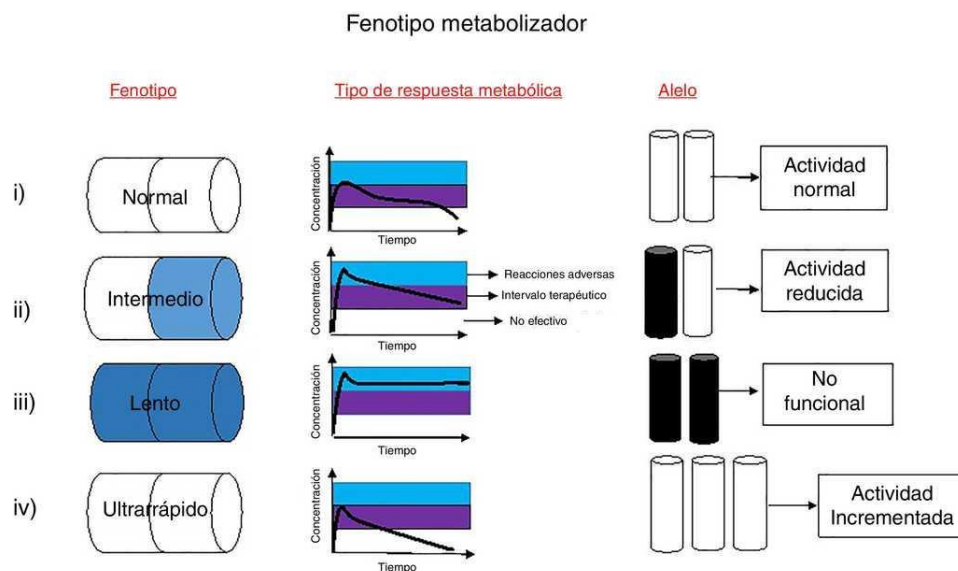


Figura 1: Fenotipos metabolizadores. Existen 4 tipos de respuestas ante los fármacos que se ven influenciados por la presencia o ausencia de alelos de determinado citocromo. Los tipos de fenotipos existentes son: i) metabolizador normal, es decir metabolizan al fármaco de forma y tiempo normal, ii) metabolizador intermedio, que metaboliza un poco más lento con respecto al metabolizador normal permaneciendo el fármaco por más tiempo en el organismo, iii) metabolizador lento, aquellos individuos con problemas para metabolizar los fármacos, demorándose más tiempo del esperado en metabolizarse (por tanto perdura más tiempo en el organismo) por lo cual se acumula y provoca intoxicaciones. Otra característica de este tipo de metabolizadores es que presentan a lo menos 2 alelos no funcionales, y iv) metabolizadores ultrarrápidos, que se caracterizan por tener una actividad metabólica incrementada por tanto requiere dosis mayores del fármaco para poder ejercer su efecto terapéutico <sup>12</sup>.

A modo de ejemplo, en la población del norte de Asia la frecuencia del fenotipo PM es de aproximadamente del 1-2% mientras que en la población caucásica el 26% de la población presenta alelos no funcionales, siendo el alelo \*4 el más representativo (20%), otros con menor frecuencia son: 2D6\*5 (2-7%), 2D6\*3 (1-2%) y 2D6\*6 (1%) <sup>13,14</sup>; la combinación de estos alelos no funcionales están asociados al 93 a 97,5% de los fenotipos metabolizadores lentos (figura 2). Existe un estudio en que se determinó que la frecuencia de MP en Chile correspondía al 10%, sin embargo no se indica al CYP responsable <sup>15</sup>. Por lo general, los datos sobre frecuencias de polimorfismos genéticos y tipos de metabolizadores varían entre las distintas poblaciones, es por esto que se requiere determinar la frecuencia de estos polimorfismos del CYP2D6 en la comunidad chilena. Dicha información apoyaría en la

optimización farmacoterapéutica, ya que la detección de PM provocado por polimorfismos de CYP2D6, permitirá realizar ajuste de dosis <sup>16</sup> o cambio de medicamento por uno que no se metabolice por este citocromo. Además, es importante señalar que la aparición de un fenotipo PM puede requerir más que un polimorfismo aislado, de una constelación de alelos no funcionales en forma hetero, homocigota o compuesta <sup>9</sup>.

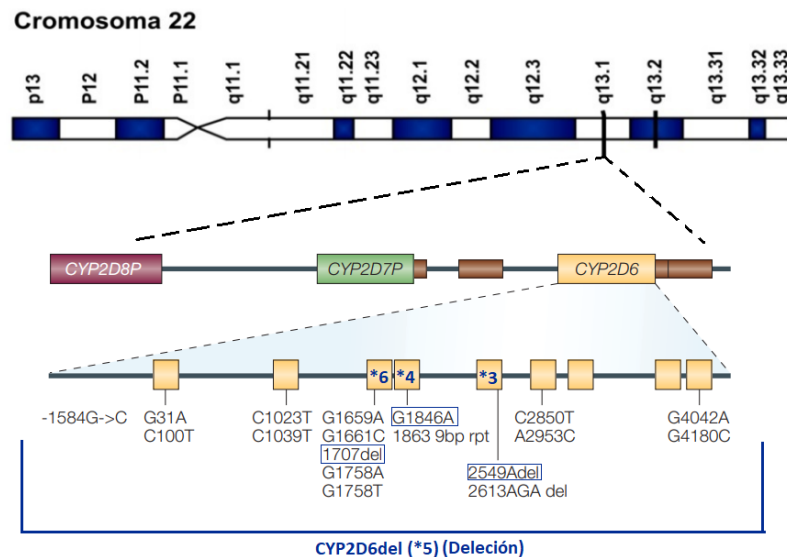


Figura 2: Enzima CYP2D6. El gen de la enzima CYP2D6 se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región q13.1 junto con el CYP2D8 Y CYP2D7. CYP2D6 presenta más de 100 alelos (\*) implicados en los distintos fenotipos metabolizadores. En el caso del alelo 2549Adel, conocido como alelo \*3, existe una delección de una A-corrimiento del marco de lectura, en G1846A (\*4) existe una sustitución de G por una A, defecto del corte y empalme, CYP2D6del (\*5) corresponde a la delección del gen de la enzima 2D6 y 1707del, correspondiente al alelo \*6 presenta una delección T-corrimiento del marco de lectura). Adaptado de <sup>11,17-19</sup>.

Entre los numerosos fármacos metabolizados por CYP2D6 se encuentran los antipsicóticos, algunos antidepresivos, beta-bloqueantes y el tamoxifeno <sup>9,15</sup>.

Tamoxifeno es un anticanceroso que modula selectivamente los receptores estrogénicos y es de uso muy frecuente en el cáncer de mama utilizándolo como coadyuvante en el tratamiento de pacientes que presentan receptores estrogénicos. Los principales citocromos involucrados en su metabolismo según estudios *in vitro* son: CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 y CYP1A2 y en estudios *in vivo* destaca el CYP2D6, el cual al metabolizar a tamoxifeno lo biotransforma a endoxifeno que es el que ejerce la actividad

anticancerosa del fármaco. La presencia de genotipo asociado a metabolizador lento disminuirá la eficacia del medicamento sin reducir los efectos adversos asociados a tamoxifeno, tales como reacciones tipo menopáusico (bochornos, síntomas menstruales, sudores, náusea, etc) que se presentan en hasta en un 60%-70% de los casos y puede llevar a discontinuar su uso<sup>20</sup>.

Otro ejemplo es tramadol, un opioide sintético, relacionado estructuralmente con la codeína que se usa para tratar el dolor agudo y crónico y a menudo se prescribe para el dolor postoperatorio y el dolor causado por el cáncer, la osteoartritis y otras enfermedades musculoesqueléticas. Este medicamento se metaboliza ampliamente en el hígado y tiene un metabolito principal, el O-desmetiltramadol, conocido como M1. Tanto el fármaco original como el M1 contribuyen al efecto analgésico y es la enzima CYP2D6 la que cataliza la producción de M1. Los efectos adversos de la terapia con tramadol son similares a los de otros opioides débiles incluyendo mareos, náuseas, estreñimiento y dolor de cabeza. Pero un riesgo adicional de la terapia con tramadol es el riesgo de convulsiones, especialmente en pacientes que están tomando antidepresivos u otras drogas que disminuyen el umbral convulsivo. En el caso de metabolizadores lentos se recomienda seleccionar un medicamento alternativo, no oxicodona o codeína, o estar atento a los síntomas de un alivio insuficiente del dolor por metabolismo lento, esto debido a que al no metabolizarse de forma normal permanece más tiempo en el organismo aumentando la exposición y aparición de efectos laterales<sup>21</sup>.

Metoprolol es un beta bloqueador selectivo  $\beta_1$  utilizado en el tratamiento de la hipertensión, la angina de pecho y la insuficiencia cardíaca. El bloqueo de estos receptores reduce la frecuencia cardíaca y disminuye la fuerza de las contracciones del corazón. Este medicamento se metaboliza principalmente por la enzima CYP2D6 y en el caso de las personas que presentan una variante en estos alelos del gen CYP2D6 se reduce la conversión de metoprolol a metabolitos inactivos, lo cual se aprecia con la aparición de bradicardia asintomática. La agencia del medicamento estadounidense (FDA) señala que aquellos que presentan un polimorfismo en los alelos del CYP2D6 que los convierte en metabolizadores lentos presentarán una disminución de la cardioselectividad para el metoprolol debido al aumento de sus niveles sanguíneos de casi 5 veces, y pueden tener un mayor riesgo de efectos secundarios. Esto en la práctica clínica se soluciona con ajuste de las dosis del metoprolol de acuerdo con la frecuencia cardíaca del paciente<sup>22</sup>.

La amitriptilina es un antidepresivo tricíclico usado en el tratamiento de varios trastornos psiquiátricos, que incluyen depresión mayor, trastorno obsesivo-compulsivo, ataques de pánico, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de estrés postraumático y bulimia. Se metaboliza principalmente a través de las vías CYP2C19 y CYP2D6. El primero produce metabolitos activos, incluida la nortriptilina el que se metaboliza por CYP2D6 y que también es un antidepresivo tricíclico, mientras que CYP2D6 cataliza la formación del metabolito 10-hidroxi que es menos activo. La FDA recomienda considerar una reducción del 50% de la dosis inicial en los MP, mientras se controlan las concentraciones plasmáticas del fármaco para evitar los efectos secundarios relacionados con toxicidad cardíaca <sup>23</sup>.

Aripiprazol es un fármaco antipsicótico de segunda generación (atípico) aprobado para el tratamiento de aumento del trastorno depresivo mayor, esquizofrenia y trastorno esquizoafectivo. Este medicamento se metaboliza por el CYP3A4 y por el CYP2D6, dando lugar principalmente a su metabolito dehidroaripiprazol, el cual puede presentar variaciones en la concentración de la molécula activa de hasta un 15-30% menor en los MP de CYP2D6<sup>24,25</sup>. Es así como pacientes no respondedores a la droga podrían estar podrían presentar variantes genéticas asociadas a metabolizadores lentos.

En países desarrollados la farmacogenómica se encuentra instalada, siendo por ejemplo las agencias regulatorias de medicamentos como la FDA con la agencia europea de medicamentos (EMA) los que incluyen información farmacogenética en las fichas técnicas de ciertos medicamentos <sup>26,27</sup>. Otro ejemplo de que ya se encuentra situada en este tipo de países es la clínica mayo de Rochester (USA), en la cual ya implementan la farmacogenética en su práctica médica asistencial <sup>28,29</sup>.

Con respecto a esto último, existe un estudio del 2002 en el cual indican las frecuencias de casi todos los alelos del CYP2D6 en la población africana, afroamericana, caucásicos, asiáticos, americanos y habitantes del continente Oceánico. Sin embargo y con respecto a los alelos estudiados en esta unidad de investigación, se puede apreciar ( tabla 1) que dicho estudio se realizó sin considerar las distintas etnias de cada país <sup>30</sup>.

Tabla 1: Frecuencia de los polimorfismos en los alelos \*3, \*4 \*5 \*6 en los distintos grupos de poblaciones.

CYP2D6 Allele	African Allele Frequency	African American Allele Frequency	Caucasian (European + North American) Allele Frequency	Middle Eastern Allele Frequency	East Asian Allele Frequency	South/Central Asian Allele Frequency	Americas Allele Frequency	Oceanian Allele Frequency
*2	19,671	15,608	26,833	21,718	12,664	28,845	22,732	1,200
*2xN	1,298	1,605	1,119	3,873	0,379	1,050	1,896	0,000
*3	0,031	0,278	1,364	0,083	0,001	0,025	0,603	0,180
*3xN								
*4	3,344	6,387	18,174	7,800	0,648	7,873	10,764	2,480
*4xN	1,498	2,065	0,222	0,000	0,000	0,150	0,578	0,000
*5	6,241	6,375	2,829	2,336	5,170	3,286	2,107	4,320
*6xN	0,000	0,227	0,000		0,000		0,000	
*6	0,000	0,216	0,960	0,576	0,015	0,000	0,335	0,000

En Chile, los estudios de genética de poblaciones se encuentran en sus inicios y más aún aquellos que se relacionan con la farmacogenética <sup>31</sup>. Destacan los estudios de Rocco y Varela quienes evaluaron algunas variantes CYP2D6 en población santiaguina, específicamente \*2,\*3,\*4,\*17 y la duplicación del gen, sin embargo, estos no abordaron todas las variantes de este citocromo asociadas a metabolizadores lentos ni validaron sus resultados mediante secuenciación y además el estudio de Varela recibió críticas posteriores a su publicación. En su mayoría las críticas se debieron a errores de comprensión del escrito debido a la redacción de los autores (como, por ejemplo, no se indica cómo se señala el genotipo salvaje, no se indica claramente la presencia de más de un polimorfismo en un mismo sujeto interpretándose como tetraploides, análisis estadísticos propuestos y no informados, entre otros). En lo personal, en lo que si concuerdo es con la falta de señalización del genotipo salvaje como \*1 ya que se interpretó como la presencia del alelo 1. Además debo señalar que cometen un serio error en agrupar y separar los datos por sexo debido a que este tipo de polimorfismo no se encuentra en el cromosoma sexual, por lo que este dato no influye en el resultado y puede conllevar a errores de interpretación <sup>15,32,33</sup>.

Existen investigaciones realizados en la Universidad de Chile y otras entidades que han hecho contribuciones significativas al conocimiento de la población nacional investigando

población de la RM y de pueblos originarios. Como ejemplo de esto se encuentra el estudio de Garay en el 2012 realizado en la población chilena en el cual evaluó variantes genéticas del CYP2D6 \*2, \*3, \*4 y \*1xN (duplicación del gen CYP2D6). Esta investigación aportó en el conocimiento de su frecuencia y la comparación con la genética española, encontrando similitud con ésta. Además, estudió la actividad de esta enzima en los distintos genotipos, **demostrando que la presencia de alelos funcionales puede compensar la presencia de alelos no funcionales.** Con respecto a los estudios en los pueblos originarios, Catalán y colaboradores señalan con respecto a CYP2D6 y la población mapuche que CYP2D6\*3 y CYP2D6\*9 se encuentran ausentes en esta población y CYP2D6\*4 y CYP2D6\*10 se encuentran en un 3,6% y 1,8%, respectivamente <sup>34,35</sup>. En la Facultad de Farmacia de la universidad de Valparaíso han existido iniciativas promovidas por las profesoras Yanneth Moya y Caroline Weinstein, que se han desarrollado a través de tesis de pre y post grado o proyectos PMI dirigidas por estudiantes, en que destacan “Detección de polimorfismo a PgP” adjudicado por Agustín Rodríguez (2016), “prototipo de kit de diagnóstico complementario para predecir la elegibilidad de metotrexato para tratamiento de pacientes con artritis reumatoidea a partir del polimorfismo C677T del gen MTHFR” adjudicado por Judith Johnson (2018) y “Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico complementario” adjudicado por Alicia Junker (2018). La presente unidad de investigación se estudió \*3, \*4 y \*6 en la población de la comuna de Valparaíso, utilizando las técnicas validadas en la tesis de postgrado “validación de un método analítico para la determinación de concentraciones plasmáticas de aripiprazol/dehidroaripiprazol y de técnicas de biología molecular para la detección de polimorfismos del gen CYP2D6 y del gen del receptor 5-HT<sub>2A</sub> presentada por Víctor Gómez (2017), a diferencia del origen de la muestra, quien las obtuvo por punción venosa. Esta unidad de investigación innova en aspectos metodológicos, con respecto a las otras investigaciones ya que implementa un método no invasivo como lo es la recolección de ADN a partir de una muestra de hisopado bucal de cada voluntario. Esto permite disminuir molestias tales como dolor, posibles efectos secundarios, aparición de infecciones como las presentes en muestras de tipo sanguínea; además de que estos pueden realizarse rápidamente y de manera ambulatoria. Por otra parte, este grupo de investigadores de la universidad de Valparaíso destaca por haber incorporado la validación metodológica de la tecnología, rangos de concentración, determinando límite de detección y especificidad.

Esta unidad de investigación permitirá acortar la brecha existente entre Chile y los países desarrollados como Estados Unidos, España y Corea del Sur, los cuales ya aplican la farmacogenómica en la medicina de precisión al indicar en los distintos medicamentos advertencias sobre su administración en pacientes portadores de ciertos polimorfismos genéticos <sup>29,36,37</sup>, al aportar con información necesaria sobre frecuencia de algunos de los polimorfismos de MP de CYP2D6 en la comuna de Valparaíso. Actualmente estas advertencias sobre la administración de los medicamentos no pueden ser implementadas en nuestro país debido a que no existen disponibles metodologías validadas para analizar los distintos tipos de genotipos de los pacientes. En síntesis, al presente en Chile solo se ha recolectado datos farmacogenómicos de ciertos grupos de la población chilena con la finalidad de ir poblando una base de datos de frecuencia alélica. Contar con esta información implicaría un ahorro potencial para el estado y para los pacientes por concepto de efectos adversos y fallo terapéutico y es por esto mismo que esta unidad de investigación busca aportar con información al respecto para la población de Valparaíso.

## **2. Objetivos**

### **2.1 General**

Generar información sobre frecuencia de variantes polimórficas de CYP2D6 asociadas a metabolizadores lentos en habitantes de la comuna de Valparaíso.

### **2.2 Específicos**

Efectuar un análisis de amplificación por PCR convencional para \*3 \*4 y \*6 del CYP2D6 en voluntarios residentes en la comuna de Valparaíso

Estimar la frecuencia de alelos \*3 \*4 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Diseño experimental

Se esquematiza el diseño experimental utilizado en el desarrollo de esta unidad de investigación. La información recolectada de los voluntarios fue: nombre, apellido y edad del participante, correo electrónico para el posterior informe de los resultados y dirección de domicilio para la confección del mapa de Valparaíso (Figura 3).

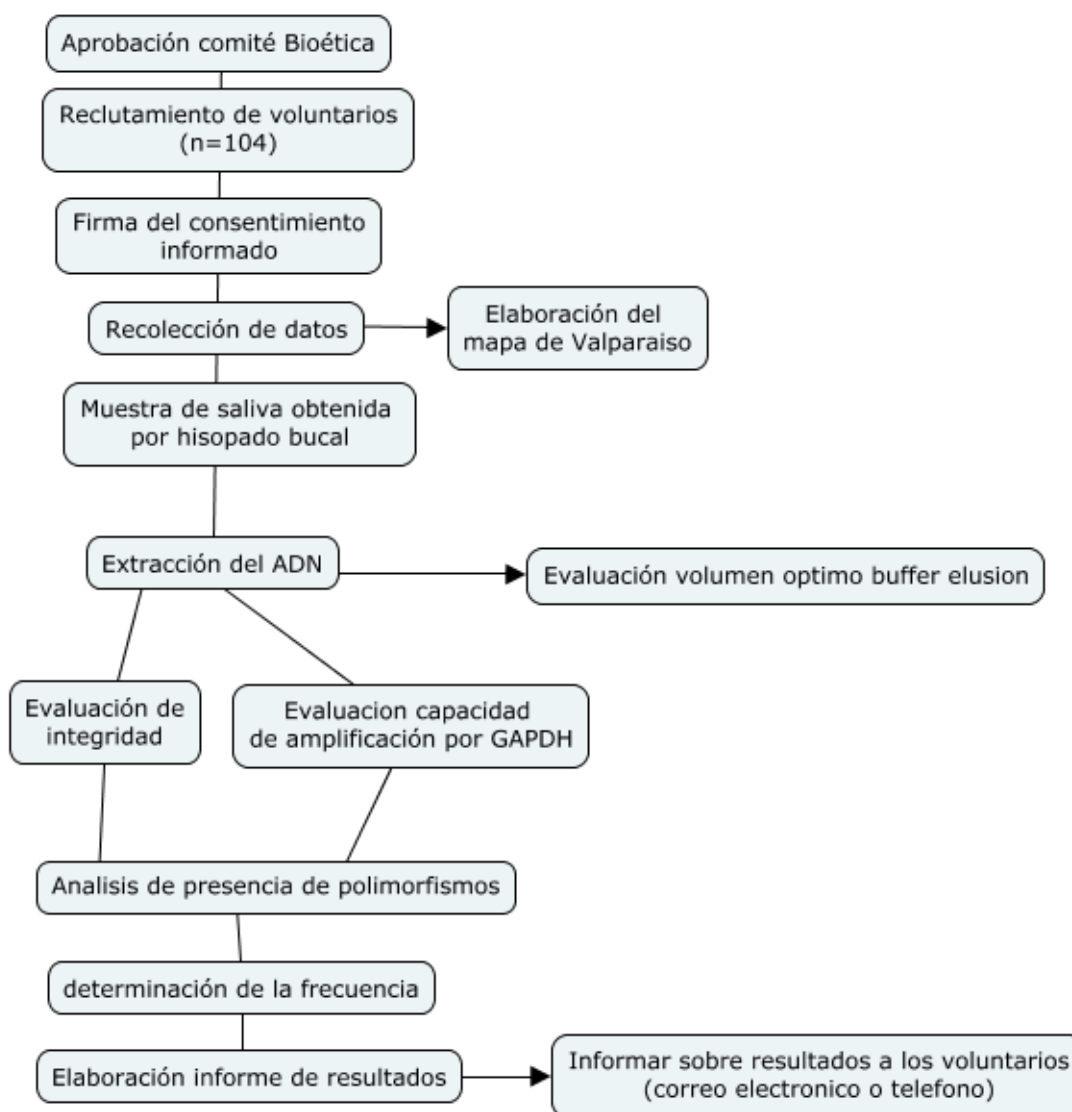


Figura 3: Esquematización del diseño experimental

### 3.2 Aspectos éticos

Protocolo de la metodología aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Farmacia de la universidad de Valparaíso (anexo 1). A todo participante previo a la toma de muestra se le fue explicado la finalidad del estudio y firmó el consentimiento informado aprobado por comité de ética de la Facultad de Farmacia correspondiente (anexo 2). La identidad de las personas y los resultados del estudio fueron mantenidos bajo estricta confidencialidad (anexo 3).

### 3.3 Características del estudio

El estudio incluyó la participación de 104 personas, según los criterios de inclusión y exclusión (tabla 2). Los participantes provinieron de distintas zonas de la comuna de Valparaíso (anexo 4) y fueron convocados a través de un afiche de difusión (anexo 5), y por intervención directa en la comunidad, asistiendo a lugares públicos y promocionando el estudio en persona.

Tabla 2: Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión	Exclusión
<ul style="list-style-type: none"> <li>• persona con residencia en la comuna de Valparaíso</li> <li>• edad entre 18 y 60 años</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• menores de 18 años y mayores a 60 años al momento de la toma de muestra</li> <li>• discapacidad mental</li> <li>• hipoacusia</li> <li>• extranjeros (turistas).</li> <li>• No haber comido mínimo 30 min antes de la toma de muestra ni haberse lavado los dientes, previo a la toma de muestra.</li> </ul>

### 3.4 Toma de muestras

Se tomó mediante un hisopo estéril realizando varias frotaciones, entre 10 a 15, en la cara interna del labio para ser lo menos invasivo posible y reducir la posibilidad de daño a la mucosa. Se almacenó y guardó el hisopado en una caja de plumavit con hielo o gel pack, posteriormente fue transportado a la Facultad de Farmacia donde fue almacenado hasta su análisis por no más de 2 semanas a temperatura entre -2 y -8°C

### 3.5 Extracción de ADN

La extracción se realizó introduciendo el hisopado bucal en un tubo de microcentrífuga junto con 25 µl de proteinasa K y 400 µl de buffer de lisis y posteriormente se realizaron 3 ciclos de vortex por 30 s e incubó a 50°C en baño seco (Termomixer, Eppendorf). Al finalizar estos ciclos, se transfirió el contenido con una micropipeta a una columna de pre-filtración junto con el hisopado el cual se transfirió con unas pinzas y centrifugó a 10.000 xg (12.000 rpm) por 1 min. Al sobrenadante resultante se le adicionó 400 µl de solución binding, se cubrió con un papel film y se mezcló suavemente por vortex unos 15s para posteriormente transferir con micropipeta el contenido a una columna de filtración y ser centrifugado a 10.000 xg por 2 min. El sobrenadante se descartó y se posicionó la columna sobre un nuevo tubo recolector, y se adicionó 500 µl de buffer HS sobre la columna y se centrifugó durante 1 min a 10.000 xg. Se descartó el sobrenadante y se posicionó la columna sobre un tubo recolector y se adicionó 750 µl de buffer MS y nuevamente se centrifugó 1 min a 10.000 xg. Luego para asegurar el paso de todo el buffer por la columna y que se encuentre totalmente libre de contaminantes se volvió a centrifugar en un nuevo tubo recolector por 2 min a máxima velocidad (11.000 xg /13.000 rpm). Finalmente, la columna se cambió a un tubo eppendorf y se le agregó un determinado volumen de buffer de elusión, se dejó reposar por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 6.000 xg (8.000 rpm). El sobrenadante resultante corresponde al material genético aislado y fue almacenado en un freezer a -80°C hasta su uso (Figura 4).

La calidad del ADN recuperado se determinó espectroscópicamente leyendo la absorbancia a 260, 280 y 230 nm mediante el equipo Nanodrop®. Además, se efectuó un análisis de electroforesis para determinar la integridad del material genético.









1. Starting material	• Buccal Swab	• Place the swab into a 1.5 ml tube
2. Lysis		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 400 <math>\mu</math>l TLS <u>and</u> 25 <math>\mu</math>l PK</li> <li>• Vortex: 5 sec</li> <li>• Incubation: 50 °C; 10 – 15 min</li> </ul>
3. Pre-filtration		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add Pre-filter to Receiver Tube</li> <li>• Add sample (swab <u>and</u> liquid) to Pre-filter</li> <li>• 10.000 x g (-12.000 rpm): 1 min</li> </ul>
4. Binding of DNA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 400 <math>\mu</math>l TBS</li> <li>• Vortex: 15 sec</li> <li>• Add Spin Filter to Receiver Tube</li> <li>• Add sample to Spin Filter</li> <li>• 10.000 x g (-12.000 rpm): 2 min</li> </ul>
5. Washing		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 500 <math>\mu</math>l HS</li> <li>• 10.000 x g (-12.000 rpm): 1 min</li> </ul>
New Receiver Tube		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 750 <math>\mu</math>l MS</li> <li>• 10.000 x g (-12.000 rpm): 1 min</li> </ul>
6. Remove Ethanol		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Discard filtrate</li> <li>• Add Spin Filter to Receiver Tube</li> <li>• Centrifuge: max speed, 2 min</li> </ul>
New Receiver Tube		
7. Elution		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add Spin Filter to an Elution Tube</li> <li>• Add Elution Buffer</li> <li>• Incubation: 1 min @ RT</li> <li>• 6.000 x g (-8.000 rpm): 1 min</li> </ul>

Figura 4: Esquema del procedimiento de extracción de ADN a partir de un hisopado bucal de BlackPREP Swap DNA kit.

### 3.6 Detección de los genes y sus variantes

Todos los partidores fueron fabricados en IDT (USA) y almacenados a -20°C (tabla 3). Antes de cada análisis los partidores fueron diluidos desde una concentración de 100  $\mu$ m a 10  $\mu$ m utilizando agua libre de nucleasas como disolvente y las muestras fueron estandarizadas a una única concentración (5 ng en 50  $\mu$ l) utilizando agua libre de nucleasas como su disolvente. Lo anterior corresponde al cálculo para 5 ensayos lo cual permitió repetir el experimento en caso de presentarse problemas en su análisis. Dichas muestras estandarizadas fueron almacenadas en un rango de temperatura de 2°C a 8°C por un

periodo de hasta 30 días. Las secuencias de cada partidor se encuentran en la tabla 3. Además, se evaluó su integridad por electroforesis horizontal a 100 v en un gel de agarosa al 0,8% p/v y a través de una amplificación de un gen constitutivo, GAPDH. Cada determinación de polimorfismo, fue basada en la técnica validada en el laboratorio por Víctor Gómez en su tesis de postgrado y la cual se detalla en cada alelo <sup>19</sup>.

**3.6.1 Detección del gen constitutivo:** Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µl goTaq green master mix, 2,5 µl de cada partidor descrito en la tabla 3, 15 ng ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 25 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 45 s y una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 2% y la presencia de una banda a los 283pb fue sinónimo de una amplificación correcta <sup>19</sup>.

**3.6.2 Detección de la variante CYP2D6\*3:** Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µl GoTaq Green Master Mix, 0,5 µl partidor 3, 0,75 µl partidor 6, 0,75 µl partidor awt, 0,5 µl partidor 4new, 50 ng ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 25 µl. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes: 2 min a 94°C, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 61°C por 30 s, 72°C por 1 min, luego 27 ciclos de 94°C por 30 s, 51°C por 30s, 72°C por 1 min y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se observaron en un gel de poliacrilamida al 5% p/v (anexo 6) en una electroforesis vertical con un voltaje constante de 50 v por aproximadamente 2 h, como resultado se pudo obtener:

Patrón de bandas en 1106 pb y en 553 pb que correspondió al genotipo salvaje (wt/wt), es decir, un gen sin polimorfismo.

Patrón de bandas en 1106 pb y 580 pb corresponde a un genotipo homocigoto para la variante (\*3/\*3).

Patrón de bandas a 1106 pb, 580 pb y 553 pb correspondió a un genotipo heterocigoto (wt/\*3) <sup>19,38</sup>.

**3.6.3 Detección de variante CYP2D6\*4:** Se realizó una mezcla de reacción 12,5 µl GoTaq Master Mix, 0,5 µl partidor 1new, 0,5 µl partidor 2new, 50ng de ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 25 µl. Las condiciones de PCR fueron: 2 min 94°C,

seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 61 °C por 30 s, 72°C por 1 min. A 2,5 µl del producto del PCR se le adicionaron 12,5 µl GoTaq Master Mix, 0,5 µl partidor Bmut, 0,5 µl partidor 7 y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 25 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2min a 94°C, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30s, 51°C por 30 s,72°C por 1 min y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los resultados del PCR se resolvieron en gel de agarosa al 2% p/v. La electroforesis horizontal se realizó con voltaje constante de 30 v por aproximadamente 2,5 h. como resultado se pudo obtener lo siguiente:

Patrón de bandas a 750 y 560 pb que corresponde a genotipo salvaje (wt/wt).

Patrón de bandas a 750 y 217 pb que corresponde a genotipo homocigoto para la variante (\*4/\*4).

Patrón de bandas en 750,560 y 217 pb que corresponde a genotipo heterocigoto (wt/\*4)

19,38

**3.6.4 Detección de la variante CYP2D6\*6:** Se realizó una mezcla de reacción 12,5µl GoTaq Master Mix, 0,5 µl partidor 1new, 0,75 µl partidor tmut, 0,75 µl partidor 11, 0,5 µl partidor 2new, 50ng de ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 25 µl. Las condiciones de PCR fueron: 2 min 94°C, seguido de 15 ciclos de 94°C por 30 s, 63 °C por 30 s, 72°C por 1 min, luego 27 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30s, 72°C por 1 min y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los resultados del PCR se resolvieron en gel de agarosa al 2% p/v. La electroforesis horizontal se realiza con voltaje constante de 30 v por aproximadamente 2,5 h. como resultado se pudo obtener lo siguiente:

Patrón de bandas 750 y 421 pb correspondió a genotipo salvaje (wt/wt).

Patrón de bandas a 750 y 356 pb correspondió a genotipo homocigoto para la variante (\*6/\*6).

Patrón de bandas en 750,421y 356 pb correspondió a genotipo heterocigoto (wt/\*6)

19,38

Tabla 3: Partidores utilizados en la determinación de las variantes polimórficas y en la evaluación del gen constitutivo.

Utilidad	Partidor	Secuencia
*3	3	5' -GCGGAGCGAGAGACCGAGGA- 3'
	6	5' -GCTAACTGAGCACG- 3'
	awt	5' -TCCCAGGTCATCCT- 3'
	4new	5' -GGTCCGGCCCTGACACTCCTTCT- 3'
*4 paso 1 y *6 paso1	1new	5' -TCCCAGCTGGAATCCGGTGTGCG-3'
	2new	5'-GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT- 3'
*4 paso 2	bmut	5' -TCTCCCACCCCAA- 3'
	7	5' -CGAAAGGGGCGTCC- 3'
*6 paso 2	tmut	5' -GTCGCTGGAGCAGG- 3'
	11	5' -TCCTCGGTCACCCA- 3'
*5	dlow	5' -CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC- 3'
	dup	5'-CACACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'
	dpkup	5' -GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA- 3'
	dpklow	5' -GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA- 3'
GAPDH	GAPDH- F	5' -CAAATGTGGGGCGATGCTG- 3'
	GAPDH- R	5' -TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT- 3'

### 3.7 Análisis de los datos

Se utilizó el software Excel de office 365 para tabular los resultados. La frecuencia se calculó como la suma del número de casos positivos para las variantes genéticas. Se analizó la frecuencia alélica, génica, y el número de casos de constelaciones (combinaciones de variantes génicas en un mismo voluntario). Además, se expresó en porcentaje.

## 4. Resultados

### 4.1 Análisis de amplificación por PCR (objetivo específico N°1)

#### 4.1.1 Calidad del ADN extraído

En la tabla N°4 se observan los resultados de un análisis sobre la determinación del mejor volumen de buffer de elusión obteniendo los siguientes valores expresados como rango (máximo-mínimo), de los parámetros de concentración (ng/uL) y pureza (A260/A280) obtenidos de la extracción de ADN de los 104 voluntarios

Tabla 4: Evaluación cualitativa de volúmenes de buffer de elusión utilizados para la extracción de ADN

cantidad de muestras	Volumen 1 (µl)	Volumen 2 (µl)	Promedio concentración 1 (ng/ µl)	Promedio concentración 2 (ng/ µl)	Promedio 1 260/280	Promedio 2 260/280
19	150	150	32,8	2,9	1,8	1,3
18	200	200	26,6	1,4	1,9	0,9
42	50	150	54,1	6,2	2,0	2,0
13	100	100	20,4	3,4	1,9	1,4
12	150	50	31,2	3,3	1,9	1,2
104						

#### 4.1.2 Integridad y capacidad de amplificación

Se evaluó la presencia de ADN intacto y la capacidad de amplificación de un gen constitutivo como GAPDH. En la figura N°5 se presenta el gel de integridad del ADN, en donde las muestras con una única banda de alto tamaño corresponden al ADN genómico intacto, mientras que la presencia de más de una banda correspondería a una muestra con degradación del ADN, y en aquellos casos en que no aparece ninguna banda representaría a un ADN degradado completamente.

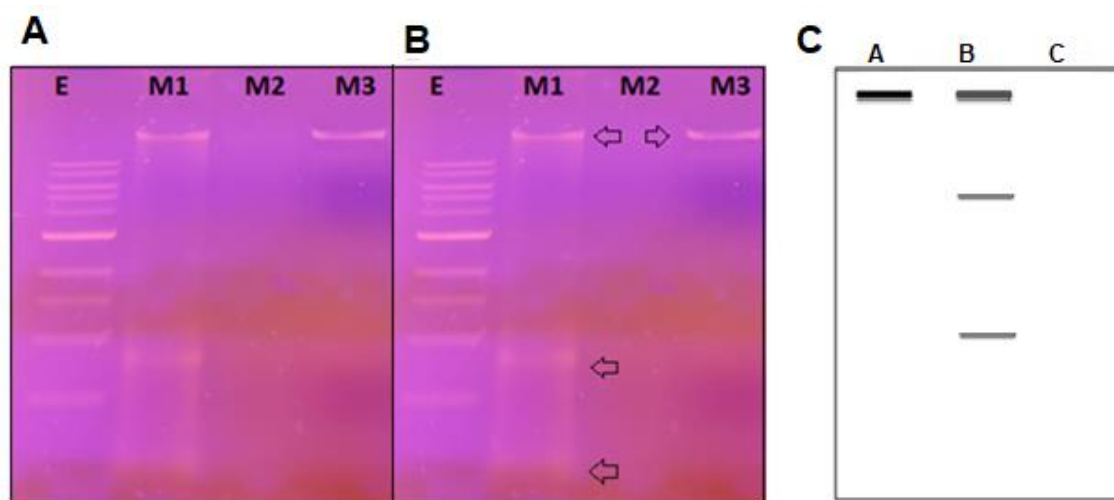


Figura 5:Gel de integridad. Gel de agarosa al 0,8% del ADN recuperado desde las muestras que se señalan. En M1 se aprecia una segunda banda a los 180 pb app lo cual significa que hay degradación incipiente. M2 no se observa esta banda única de alto peso molecular, dando cuenta que la muestra se ha degradado completamente. M3 correspondería a una muestra íntegra. En el panel C se aprecia un diagrama representativo de una muestra íntegra (A), una con degradación incipiente (B) y una columna sin apreciación de ninguna banda, indicativo de una muestra que se ha degradado (C).

La capacidad de amplificar del gen constitutivo se usa como medida adicional de la integridad del material genético. Debe apreciarse una única banda a 283 pb para demostrar integridad (Fig.6).

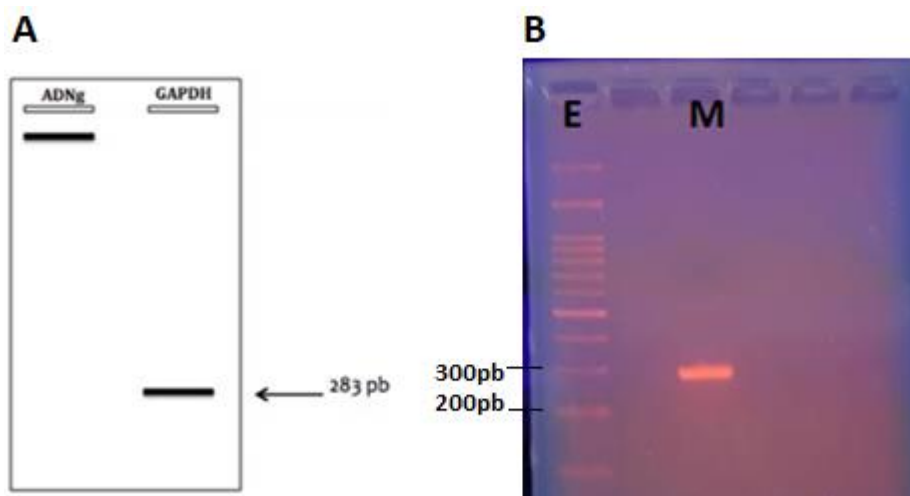


Figura 6:Gel Gen Constitutivo Diagrama del resultado esperado para el gen GAPDH (Panel A) y amplicón obtenido en un gel de agarosa al 2% en el panel B. Se utiliza una escalera (E) de 100 pb y M corresponde a la muestra.

### 4.1.3 Detección de la variante CYP2D6\*3

Se explica el diseño de la PCR anidada y los resultados posibles para los genotipos, wt, \*3 o ambos en la figura n°7.

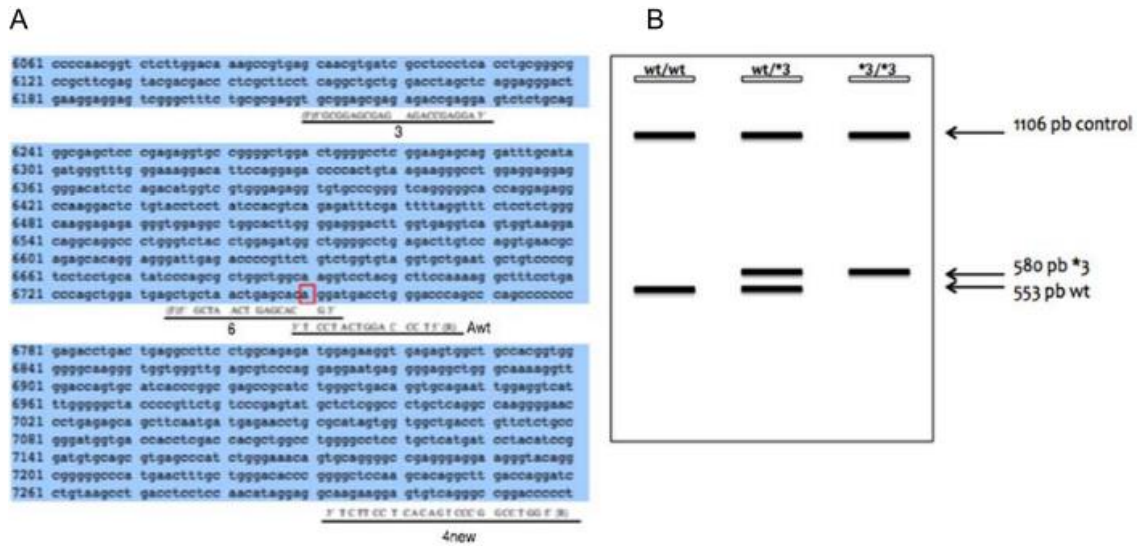


Figura 7: Esquema PCR anidada de 1 paso para CYP2D6\*3 y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. En el panel A se observa una secuencia parcial del gen CYP2D6 con los partidores utilizados alineados. El amplicón de 1106 pb (control interno) se genera por la amplificación entre los partidores 3 y 4new. El alelo salvaje que posee A genera un amplicón de 553 pb por amplificación entre el partidore Awt y el partidore 3, mientras que el alelo \*3 presenta una delección de esta A y en consecuencia se alinea el partidore 6 y en conjunto con 4new generan un amplicón de 580 pb. En B se observa un diagrama que representa un patrón homocigoto salvaje (wt/wt) compuesto de dos bandas (control interno más banda a 553 pb), un patrón heterocigoto (wt/\*3) de tres bandas (control interno, bandas a 553 y 580 pb) y un patrón homocigoto para la variante (\*3/\*3) de dos bandas (control interno más banda a 580 pb) <sup>19</sup>.

En la figura N°8 se presentan resultados representativos del estudio de la variante CYP2D6\*3. Entre las 104 muestras se identifica los 3 genotipos posibles.

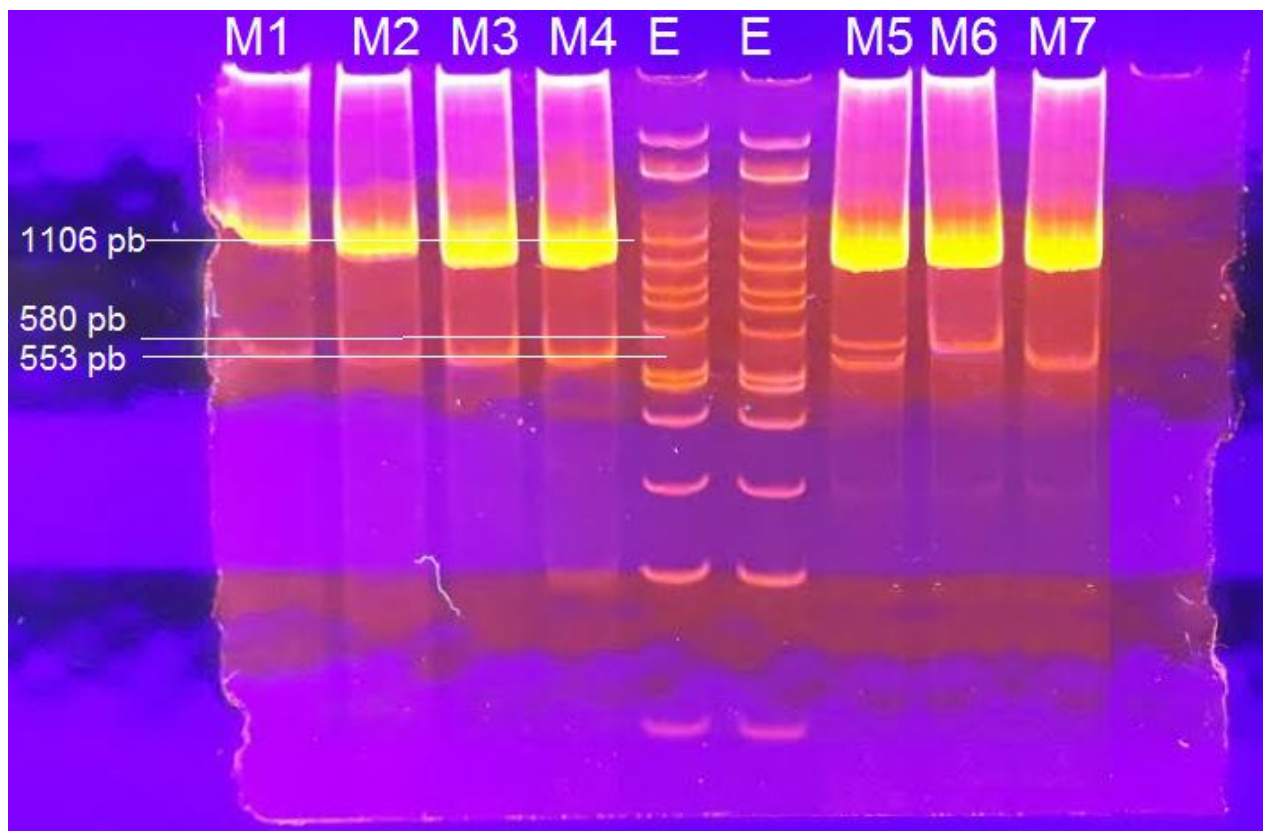


Figura 8: Gel variante CYP2D6\*3. Análisis de la variante CYP2D6\*3 en un gel de poliacrilamida 5%. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, M1-M2-M3-M4-M7 demuestran un patrón de bandas consistente con un genotipo salvaje (wt/wt), M5 patrón heterocigoto (wt/\*3) y M6 patrón consistente con un genotipo homocigoto para la variante (\*3/\*3).

#### 4.1.4 Detección de la variante CYP2D6\*4

Se presenta un esquema explicativo de la PCR anidada y un diagrama de los patrones de amplicones esperados para cada genotipo según la presencia del alelo wt, alelo \*4 o ambos en la Figura N°9.

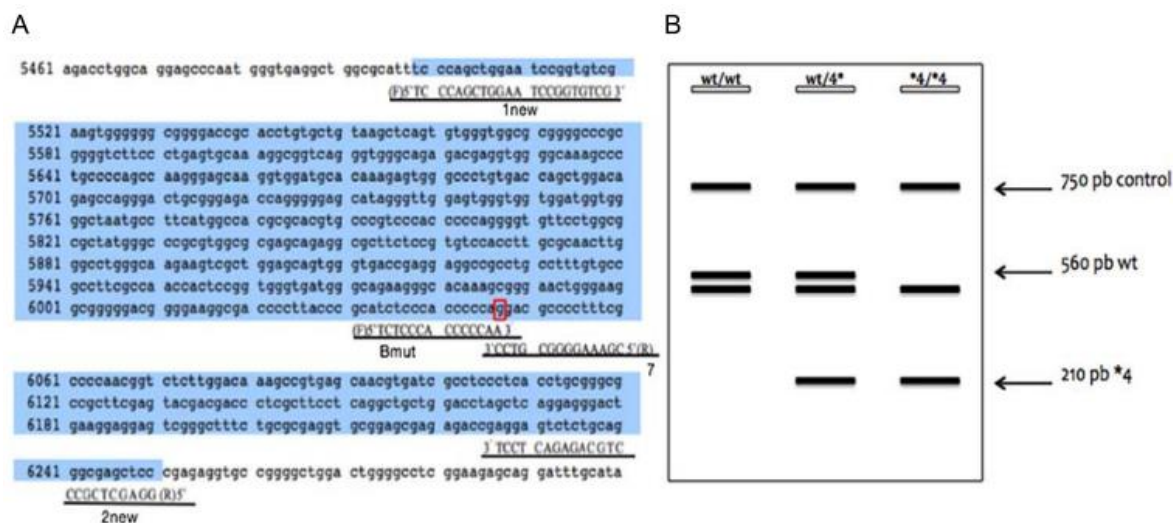


Figura 9 Esquema de la PCR anidada en dos pasos y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. En el panel A se observa una secuencia parcial del gen CYP2D6 con los partidores utilizados alineados. El amplicón 750 pb (control interno) se genera por la amplificación entre los partidores 1new y 2new. El alelo salvaje posee G y genera un amplicón de 560 pb por la amplificación entre el partidor 1new y el partidor 7, mientras que el alelo \*4 presenta A y alinea el partidor Bmut con el partidor 2new generando un amplicón de 217 pb. En B se observa un diagrama que representa un patrón homocigoto salvaje (wt/wt) compuesto por el control interno más un doblete (banda 560 pb más una banda de menor tamaño molecular), un patrón heterocigoto (wt/\*4) conformado por el control interno, el doblete y la banda de 217 pb y un patrón homocigoto para la variante (\*4/\*4) de tres bandas compuestas por el control interno más una banda 217 pb (se pierde el doblete al no existir la banda de 560 pb) <sup>19</sup>.

En la figura N°10 se muestra un resultado representativo de electroforesis de amplicones para la variante CYP2D6\*4. Entre las 104 muestras analizadas se detectó los tres genotipos posibles

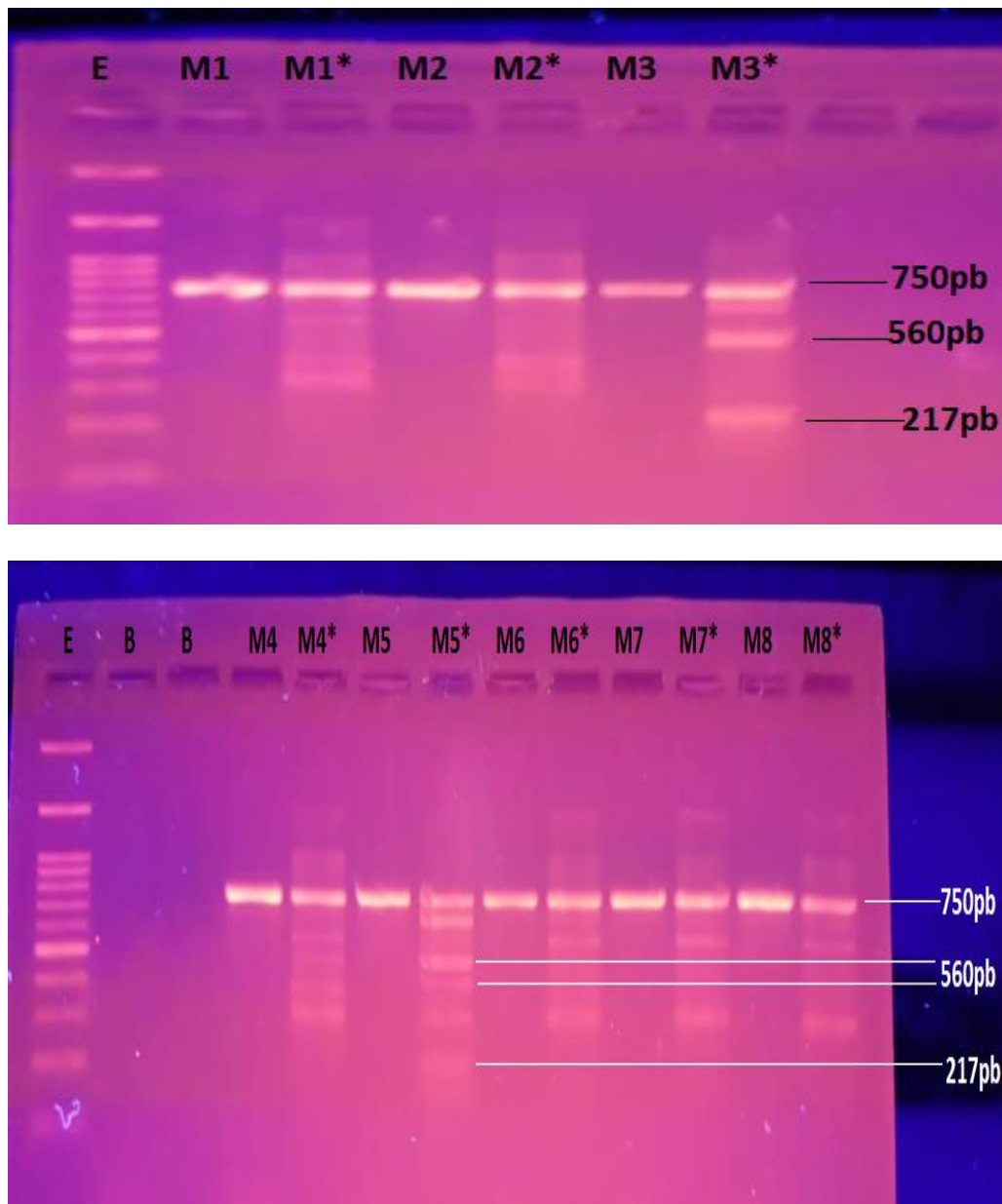


Figura 10 Gel de agarosa al 2% para la variante CYP2D6\*4. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, B corresponde a un control negativo, M1-M2-M3-M4-M5-M6-M7 Y M8 corresponden a controles de la primera amplificación, M1\*-M2\*-M4\*-M6\*-M7\* Y M8\* demuestran un patrón de bandas consistente con un genotipo salvaje( wt/wt), M3\* demuestran un patrón de bandas consistente con un genotipo homocigoto para la variante (\*4/\*4), y M5\* demuestran un patrón de bandas consistente con un genotipo heterocigoto (wt/\*4).

### 4.1.5 Detección de la variante CYP2D6\*6

Se explica el diseño de la PCR anidada y un diagrama de los patrones de amplicones esperados para cada genotipo en la Figura N°11.

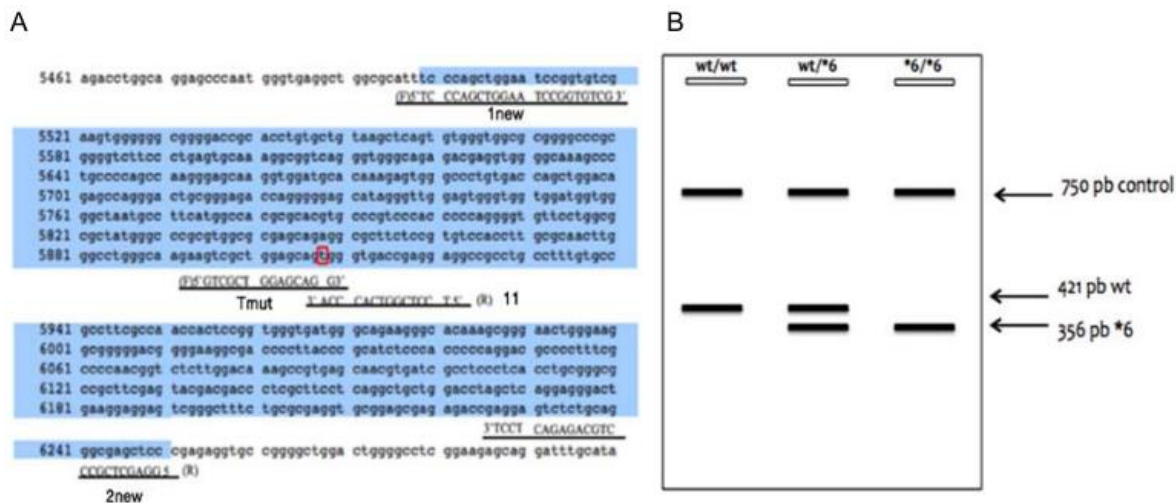


Figura 11 Esquema de la PCR anidada en un paso y diagrama de los patrones electroforéticos para cada genotipo. En A se observa una secuencia parcial del gen CYP2D6 con los partidores utilizados alineados. El amplicón 750 pb (control interno) se genera por la amplificación entre los partidores 1new y 2new. En el alelo wt hay T y se genera un amplicón de 421 pb entre el partidore 11 y el partidore 1new, mientras que el alelo \*6 carece de T, lo que permite el alineamiento del partidore Tmut que con el partidore 2new generan un amplicón de 356 pb. En B se observa un diagrama que representa un patrón homocigoto salvaje (wt/wt) compuesto por el control interno más una banda 421 pb, un patrón heterocigoto (wt/\*6) conformado por el control interno, una banda de 421 y 356 pb, y un patrón homocigoto para la variante (\*6/\*6) de dos bandas compuestas por el control interno más una banda 356 pb.<sup>19</sup>

En la figura N°12 se muestra un resultado representativo de la electroforesis de amplicones para la variante CYP2D6\*6. De las 104 muestras analizadas, se logró detectar los 3 tipos de genotipos posibles.

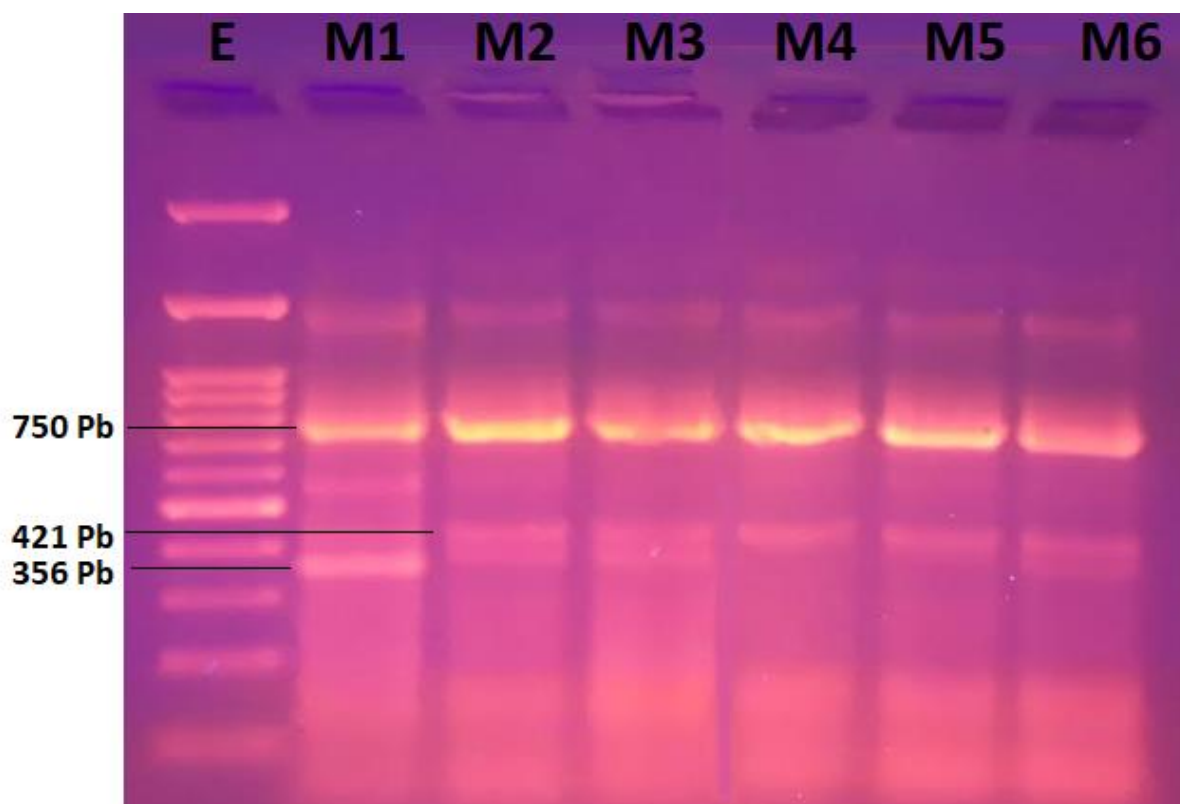


Figura 12 Gel de agarosa 2% para análisis de la variante CYP2D6\*6. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, M1 muestra con patrón de bandas consistente con homocigoto para la variante (\*6/\*6), M2, M3 Y M6 patrón heterocigoto (wt/\*6) y M4 Y M5 patrón homocigoto salvaje (wt/wt).

## 4.2 Análisis de frecuencias (Objetivo específico N°2)

Los datos de frecuencia alélica y genotípica se presentan en las tablas n°5 y n°6. Para la frecuencia genotípica se informa el valor informado en Kramer et al, 2011 y en Preskorn & Flockhart,2009. La frecuencia fenotípica se expresa como posibles fenotipos metabolizadores de los pacientes.

Tabla 5:Resultados de frecuencia alélica (n=208)

Frecuencia alélica para las variantes CYP2D6*3, CYP2D6*4 y CYP2D6*6			
Polimorfismo	Alelo	Frecuencia	Porcentaje (%)
CYP2D6*3	Wt	160	76,92
	*3	48	23,08
CYP2D6*4	Wt	179	86,06
	*4	29	13,94
CYP2D6*6	Wt	178	85,58
	*6	30	14,42

Tabla 6:Resultados de frecuencia genotípica para las variantes CYP\*3, CYP2D6\*4 y CYP2D6\*6 (n=104)

Polimorfismo	Frecuencia genotípica y fenotípico potencial				Fenotipo potencial
	Genotipo	Frecuencia	Porcentaje (%)	% en caucásicos ref	
CYP2D6*3	Wt/wt	79	75,96		ME
	Wt/*3	2	1,92	2	MI
	*3/*3	23	22,12		MP
CYP2D6*4	Wt/wt	79	75,96		ME
	Wt/*4	21	20,19	20	MI
	*4/*4	4	3,85		MP
CYP2D6*6	Wt/wt	75	72,12		ME
	Wt/*6	28	26,92	1	MI
	*6/*6	1	0,96		MP

ME: metabolizador extensivo; MI metabolizador intermedio; MP metabolizador pobre.

Referencia de % en caucásicos: <sup>13,14</sup>

Los datos de frecuencia de constelaciones entre 2 y 3 polimorfismos se presentan en las tablas nº7 y nº8. Se informa las constelaciones alélicas encontradas, encontrándose que 13 pacientes presentan dos de los polimorfismos estudiados y 4 exhiben los tres polimorfismos estudiados.

Tabla 7:Frecuencia de constelaciones alélicas entre 2 polimorfismos

Posibles combinaciones: (2<sup>2</sup>)

Variantes *3 y *4	Nº de casos	% ocurrencia	Variantes *3 y *6	Nº de casos	% ocurrencia	Variantes *4 y *6	Nº de casos	% ocurrencia
3e+4e	0	0	3e+6e	1	0,10	4e+6e	6	5,77
3e+4o	0	0	3e+6o	0	0	4e+6o	0	0
3o+4o	0	0	3 <sup>o</sup> +6o	0	0	4 <sup>o</sup> +6o	0	0
3o+4e	4	3,85	3o+6e	1	0,10	4o+6e	1	0,10

Siglas: o=homocigoto e= heterocigoto

- Frecuencia total de constelaciones alélicas entre 2 polimorfismos: 9,92% de la población estudiada

Tabla 8:frecuencia de constelaciones alélicas entre los 3 polimorfismos

Posibles combinaciones: (2<sup>3</sup>)

Entre *3,*4 y *6	Nº de casos	% ocurrencia
3e+4e+6e	0	0
3e+4e+6 <sup>o</sup>	0	0
3e+4o+6e	0	0
3e+4o+6 <sup>o</sup>	0	0
3o+4o+6 <sup>o</sup>	0	0
3o+4e+6 <sup>o</sup>	0	0
3o+4e+6e	3	2,88
3o+4o+6e	1	0,10

Siglas: o=homocigoto e= heterocigoto

- Frecuencia total de constelaciones alélicas entre 3 polimorfismos: 2.98% de la población estudiada

## 5. Discusión

Los medicamentos exhiben una alta variabilidad de respuestas en los individuos al ser fenotipo-metabólico dependientes<sup>39</sup>. La manera en que se metabolizan los fármacos influye en la eficacia, tolerancia y aparición de reacciones adversas inesperadas que afectan la salud del paciente llegando incluso a poner en riesgo su vida. Esto último con consecuencias sociales y económicas para el paciente y la sociedad. Es por esto, que el contar con herramientas de laboratorio que permitan determinar el genotipo y fenotipo del paciente permitiría predecir los efectos de un fármaco, determinar las dosificaciones y sus intervalos de administración idóneas a sus características, es decir, poner en práctica la medicina personalizada<sup>2,40</sup>.

CYP2D6 es un miembro altamente polimórfico que actúa tanto a nivel del sistema nervioso central (SNC) como del sistema circulatorio, es responsable del metabolismo del 25% de los fármacos, entre ellos beta bloqueadores, antiarrítmicos, antipsicóticos, antidepresivos tricíclicos, opioides, entre otros<sup>9,15</sup>. De acuerdo a los medicamentos señalados, se decidió enfocar el estudio en los casos de metabolismo pobre por dicho citocromo siendo los alelos \*3, \*4, \*5 y \*6 los constituyentes del 93 a 97,5% de los fenotipos metabolizadores lentos<sup>38</sup>. Sin embargo, no se logró realizar la determinación del polimorfismo \*5 a partir de las muestras obtenidas en el tiempo estipulado para esta unidad de investigación. Una de las explicaciones posibles es que, en este alelo en particular, el gen analizado es de gran tamaño, del orden de las Kilobases (Kb), específicamente entre 5 y 3 Kb (según el alelo fuera wt o variante\*5), mientras que los otros alelos analizados se encontraban en el orden de 200 a 1100 pares de bases (pb)<sup>38</sup>. Esto cobra importancia cuando se analiza ya que, al ser un gen de mayor tamaño la integridad de la muestra toma una importancia mayor. En este sentido a diferencia de Gómez, quien logró amplificar el gen wt, en esta tesis se usó una muestra de hisopado bucal en vez de sangre que podría generar ADN de inferior calidad, no aptas para amplicones de mayor tamaño. Para verificar esta hipótesis se propone efectuar a futuro un análisis en paralelo de ADN extraídos desde sangre e hisopado bucal. Otra variable que puede afectar la amplificación de segmentos de mayor tamaño es la calidad de la polimerasa, si bien Gómez trabajó con la GoTaq Green Master Mix, la literatura recomienda usar polimerasas especializadas en fragmentos de mayor tamaño como la Expand long template PCR System<sup>41</sup>.

La población de estudio en esta investigación corresponde a voluntarios de la comuna de Valparaíso, quienes debieron cumplir los criterios de inclusión. Por este motivo se les solicitaron datos personales como la edad y la dirección. Esto último permitió la realización de un mapa de Valparaíso donde se ubicó de donde procedía cada muestra para exponer la diversidad de procedencias de las muestras (anexo 4). Sin embargo, a pesar del intento de obtener muestras homogéneamente distribuidas, se aprecia que hubo un desbalance de la muestra con voluntarios que más frecuentemente provenían de Playa Ancha, Cerro Placeres y plan de Valparaíso. Esto destaca la importancia de generar sistemas aleatorios de selección de voluntarios a través de programas computacionales específicos que usan sistema de geo-referenciación <sup>42</sup>. Es importante destacar que se tuvo la precaución de buscar voluntarios no emparentados, para no alterar la frecuencia genotípica por parentesco.

Según Aguilar-Barojas, el tamaño muestral se puede estimar a partir de la fórmula que se presenta en la figura 14 <sup>43</sup>, donde  $n$  corresponde al número de personas a muestrear,  $N$  al tamaño de la población,  $Z$  al nivel de confianza también llamado seguridad,  $p$  a la proporción del fenómeno a analizar,  $q$  a la proporción de la población que no presenta el fenómeno, y  $d$  corresponde al nivel de precisión absoluta. Si se utiliza la información del censo 2017 que indica que la población en la comuna de Valparaíso es de 296.655 habitantes, y utilizando los valores comúnmente introducidos para este tipo de fórmulas que corresponde a una seguridad del 95%, una proporción de casos con polimorfismo esperada del 5% y una precisión del 3% se obtiene como resultado un  $n$  igual a 203. Sin embargo, esto no considera la existencia de una población que no cumplen los criterios de inclusión, por lo que, mediante la información proporcionada por la biblioteca del congreso nacional la nueva población a estudiar contaría con 204.334 individuos y si se disminuye la seguridad al 90% se obtendría un  $n$  correspondiente a 80 individuos. Para establecer un margen de mayor seguridad en los resultados se reclutó un número de individuos superior al solicitado por la fórmula <sup>44</sup>.

$$n = \frac{N \times Z^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z^2 \times p \times q}$$

Figura 13: Fórmula de cálculo de tamaño de muestra

Dentro del protocolo de toma de muestra se solicitó que los participantes tuvieran los dientes lavados y no haber consumido alimentos mínimo 30 minutos antes de la toma de muestra según lo sugiere la literatura <sup>45</sup>. Sin embargo, no todos los voluntarios (15) cumplieron con la solicitud de no lavarse previamente los dientes, asunto que fue informado posterior a la toma de muestra o análisis de la misma. Al realizar la extracción de ADN de las muestras se visualizó que los resultados de ADN obtenidos eran significativamente bajos en comparación con aquellos que si acataron dicha solicitud. Las concentraciones oscilaban entre 0 y 4 ng/ $\mu$ l, siendo su promedio 1,72 ng/ $\mu$ l. Estas muestras fueron descartadas, perjudicando el tamaño de muestra disponible para este estudio.

Se evaluó empíricamente el volumen de elusión ideal para este tipo de técnica a pesar de que el prospecto indicaba un valor de 200  $\mu$ l del buffer, y luego de eluir varias muestras con distintos volúmenes se determinó que la mejor era aquella en que el primer volumen de elusión era de 50  $\mu$ l de buffer de elusión, y la segunda de 150  $\mu$ l <sup>46</sup>. Sin embargo, con esta última se obtiene poco volumen de muestra, por lo que se recomienda realizar la elusión solo una vez y con un volumen de 150 $\mu$ l.

En cuanto a la integridad del ADN genómico, esta se determinó por observación de un patrón electroforético, en la que, la aparición de una única banda de alto peso molecular bien definida señalaba la presencia de un ADN integro, mientras que la apreciación de una banda débil y bandas en más secciones del gel fueron indicativo de un ADN fragmentado y en vías de degradación. La no aparición de ninguna banda en este gel, o de una banda muy tenue apunta a la degradación total de la muestra por tanto dicha muestra ya no sería útil para los distintos análisis. Esta degradación podría ser atribuida al número de ciclos de congelamiento y descongelamiento, lo cual aparentemente promueve la degradación del ADN extraído. Kopreski en 1999 sugiere que cada ciclo de descongelamiento afectaba al menos en un 10% en su capacidad de amplificación, lo cual puede interpretarse como efecto a su degradación <sup>47</sup>. Por lo anteriormente expuesto, se recomienda alicuotar las muestras si es que se desea utilizar en más de 10 ciclos de descongelamiento. Estas se podrán almacenar entre 2 y 8°C durante 1 mes, manteniéndose íntegras <sup>48,49</sup>.

También se evaluaron las cualidades del ADN genómico aislado mediante la amplificación de un gen constitutivo como lo es GAPDH. Este amplifica correctamente con una única

banda observable al tamaño de banda esperado, lo cual refleja que la calidad del ADN es adecuada para los análisis posteriores <sup>50</sup>.

Todas las muestras de ADN extraídas presentaban una concentración distinta del material genético, lo cual provocaba que el trabajo matemático (cálculos sobre volúmenes requeridos de cada muestra de ADN para presentar 50 ng en cada tubo de reacción) lo cual incidía en que posteriormente había que pipetear diferentes volúmenes para cada muestra siendo una potencial fuente de error. Es por esto y debido a que la cantidad de ADN requerido para las amplificaciones de \*3 \*4 y \*6 eran iguales (50 ng)<sup>19</sup> es que se procedió a la elaboración de un stock alicuotado previo que fue llevado a una misma concentración utilizando agua libre de nucleasas. Esto permitió que cuando fuera necesario analizar las distintas muestras, el volumen a sacar fuera uno ya estandarizado y permitió que el operador trabajara eficientemente.

Al ser los volúmenes de los partidores relativamente bajos (0,5 a 0,75 uL por muestra), existía una alta probabilidad de error a la hora de pipetear, error analítico, que aumentaba con el número de muestras procesadas por cada sesión. Para evitar y disminuir dicho error se procedió a la elaboración de un stock de partidores previo al trabajo de laboratorio, que consistía en la mezcla de los partidores en un tubo PCR para que cuando fuera necesario agregar a la muestra el volumen a tomar fuera mayor.

No todos los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa como se observa en el estudio del polimorfismo del CYP2D6\*3. Esto se debe a que, de acuerdo a la tesis de Víctor Gómez, la separación de las bandas en este tipo de geles presenta una mayor resolución que en los geles de agarosa, por lo que la apreciación del polimorfismo será más eficiente disminuyendo el riesgo a mal interpretar las bandas en casos de patrones homocigotos, con bandas de tamaños muy similares <sup>19</sup>. Es interesante destacar que en el presente trabajo se logró identificar los tres posibles genotipos de este polimorfismo, a diferencia de Gómez quien no encontró el homocigoto para la variante. Esto se puede atribuir a diferencias experimentales, ya que en esta unidad de investigación la electroforesis se desarrolló por dos en vez de una hora. Alternativamente, hay que considerar la diferencia en el número de individuos muestreados (104 vs 40 en Gómez) y en el requisito de que estos pertenecieran a la comuna de Valparaíso donde tal vez pudo haber una variante fundadora<sup>51</sup>. Se propone secuenciar las muestras de los individuos homocigotos para la

variante para dejar definitivamente válida la metodología. Las frecuencias alélicas y génicas encontradas en este estudio fueron superiores a las descritas en la literatura <sup>13,14</sup>.

Las frecuencias alélicas y génicas para CYP2D6\*4 han sido reportadas en la literatura como las de mayor frecuencia en la población, siendo la frecuencia génica reportada para caucásicos de un 20%. En esta investigación se determinó una frecuencia génica de 3,9%, inferior a lo esperado y que se podría atribuir a la diversidad étnica de la población de la comunidad de Valparaíso.

En el caso de CYP2D6\*6, la literatura informa una frecuencia génica de un 1% para esta variante en población caucásica. En este estudio se encontró un valor de 0,96%, consistente con la información previa para esta población. La discordancia con los resultados de diferentes variantes respecto a la población caucásica será materia de otro estudio, ya que escapa a los objetivos de esta unidad de investigación.

El análisis global de los resultados permitió visualizar la presencia de más de un SNP por individuo, presentándose hasta los 3 SNP estudiados en 4 individuos de la población. Esto señala un desequilibrio de polimorfismo de CYP2D6 otorgando un metabolismo pobre a dichos individuos, o bien, es posible que la nomenclatura actual se encuentre errada ya que sólo analiza la presencia de un único polimorfismo. A nivel científico se ha propuesto el término de constelaciones alélicas, en el cual se define a un haplotipo como la presencia de más de un SNP en un gen, heredado en bloque <sup>9</sup>. De acuerdo a esto se confeccionaron las tablas 7 y 8 donde se visualiza que las combinaciones más comunes entre estos alelos resultaron ser, en el caso de las constelaciones entre 2 alelos la de (wt/\*4)/(wt/\*6) con un 5,77% de ocurrencia y (\*3/\*3)/(wt/\*4) con un 3,85% de ocurrencia. En el caso de las constelaciones alélicas entre los 3 alelos estudiados, la combinación más frecuente fue la que presentaba un fenotipo homocigoto para \*3, y fenotipos heterocigotos para los fenotipos \*4 y \*6 con una probabilidad de ocurrencia del 2,88%. La determinación de la herencia en bloque, es decir, de la presencia de un haplotipo, requeriría de un estudio genético familiar. Se puede especular que individuos con al menos una constelación alélica de dos variantes de MP tendrá mayor probabilidad de ser fenotípicamente metabolizadores lentos.

La identificación de la existencia de un alelo homocigoto en un individuo no es un criterio de exclusión para evaluar los otros posibles polimorfismos presentes ya que existen las constelaciones alélicas. Con respecto a esto mismo, la presencia de alelos con fenotipo PM

no es suficiente para clasificar a un individuo como tal, ya que podría presentar otro SNP con fenotipo de UM. En consecuencia, para la clasificación de los individuos en sus respectivos fenotipos metabolizadores se requieren de estudios de actividad enzimática CYP2D6<sup>34,52,53</sup>.

El conocimiento de este factor genético sobre el metabolismo y su impacto sobre la respuesta a la farmacoterapéutica es una herramienta promisoría para el empleo de estrategias que aseguren la seguridad y respuesta terapéutica del paciente, ya sea ajustando las dosis, disminuyéndolas o aumentando los intervalos entre dosis para los pacientes catalogados como metabolizadores lentos o cambiando el medicamento. De esta manera el conocimiento genotípico de CYP2D6 posee proyección clínica para los pacientes. Sin embargo, es importante destacar que las tecnologías y comprensión actual del genoma no permiten generar una declaración sobre el tipo de fenotipo general del paciente, sino que permite establecer pautas para personalizar las terapias, ya que como se dijo anteriormente, la existencia de estos alelos no imposibilita la presencia de otros polimorfismos dentro del mismo gen, los cuales podrían contribuir a un metabolismo rápido “anulando” el efecto del metabolismo lento. Por lo tanto, a pesar del conocimiento que se ha generado sobre el tema, su aplicación a la clínica requiere profundizar, ampliar e integrar las investigaciones para llegar al ideal de poder predecir el mejor medicamento y su dosis óptima en forma personalizada.

## 6. Conclusión

1. Existen aspectos metodológicos fundamentales para un buen análisis de polimorfismo genético a través de hisopado bucal. Entre estos, una buena preservación de la muestra evitando ciclos de congelación-descongelación y evitar la toma de volúmenes pequeños mediante la preparación de soluciones maestras de trabajo.
2. La frecuencia genotípica de CYP2D6\*6 en la comuna de Valparaíso es consistente con los valores descritos en la literatura. Por el contrario, la frecuencia genotípica de CYP2D6\*4 es inferior a lo esperado y la de CYP2D6 \*3 es superior a los valores teóricos.
3. En la población estudiada se identificaron individuos que presentan dos y tres variantes genéticas (9,92% y 2,98% respectivamente) asociadas a metabolización pobre por CYP2D6 (constelaciones alélicas).

## 7. Bibliografía

1. Gervasini, G. Farmacogenética y medicina personalizada. ¿Se están cumpliendo las expectativas? *Med. Clin. (Barc)*. **152**, 368–371 (2019).
2. Gurrola, S. B., Jovani, E., Guevara, T., Javier, H. & Ramírez, C. Farmacogenética y farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. *Rev. la Fac. Med.* **53**, 55–59 (2010).
3. Escalante, P. *et al.* Farmacogenómica como herramienta fundamental para la medicina personalizada: aplicaciones en la práctica clínica. 483–500 (2017).
4. Spear, B. B., Heath-chiozzi, M., Huff, J. & Heath-chiozzi, M. Clinical application of pharmacogenetics. **7**, 201–204 (2001).
5. Pirmohamed, M. *et al.* Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. **329**, 15–19 (2004).
6. Davies, E. C. *et al.* Adverse Drug Reactions in Hospital In-Patients : A Prospective Analysis of 3695 Patient-Episodes. **4**, (2009).
7. Spalvieri, M. P. & Rotenberg, R. G. Aplicaciones del polimorfismo de un nucleotido y micromatrices de ADN. *Medicina (B. Aires)*. **64**, 533–542 (2004).
8. Casas, P. M., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V. & Lopéz, M. Bases moleculares de los principales polimorfismos del gen CYP2D6, Diferencias étnicas y consecuencias farmacológicas. *Ciencia e Investigación* **2**, 89–101 (2007).
9. Zhou, S. *et al.* Clinical Pharmacogenetics and Potential Application in Personalized Medicine. 738–784 (2008).
10. I, H. R. B. *et al.* Frecuencia de la variante alélica CYP2D6 \* 6 en una muestra de la población cubana Frequency of allelic variant CYP2D6 \* 6 in a sample of the Cuban population. **13**, 830–836 (2014).
11. Yang, Y., Botton, M.-R., Scott, E.-R. & Scott, S.-A. Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. **18**, 673–685 (2017).

12. Gómez, S. V., Torresa, I., Manrique, R. D., Duque, M. & Gallo, J. E. Aplicación farmacogenómica de los genes CYP2C19, CYP2C9 y VKORC1 implicados en el metabolismo de los fármacos clopidogrel y warfarina. *Rev. Colomb. Cardiol.* **25**, 396–404 (2018).
13. Kramer, V., Marín, J. C., Ph, D., Yarur, A. & Hormazábal, M. D. M. Variantes Alélicas \* 4 Y \* 6 De Citocromo P450 2D6 : Estudio Piloto . **4**, 9–14 (2011).
14. Preskorn, S. H. & Flockhart, D. Guide To Psychiatric Drug Interactions. *Prim. Psychiatry* **16**, 45–74 (2009).
15. Varela, N. *et al.* Characterization of the CYP2D6 drug metabolizing phenotypes of the Chilean mestizo population through polymorphism analyses. *Pharmacol. Res.* **101**, 124–129 (2015).
16. Martínez de Dueñas, E. *et al.* Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast* **23**, 400–406 (2014).
17. Chiurillo, M.-A., Grimán, P., Morán, Y., Camargo, M.-E. & Ramírez, J.-L. Analysis of CYP2D6 gene variation in Venezuelan population: Implications for forensic toxicology. **2**, 483–484 (2009).
18. Koch, W. H. FOCUS ON PHARMACOGENETICS TECHNOLOGY PLATFORMS FOR PHARMACOGENOMIC DIAGNOSTIC ASSAYS. **3**, (2004).
19. Gómez, V. Validación de un método analítico para la determinación de concentraciones plasmáticas de aripiprazol/dehidroaripiprazol y de técnicas de biología molecular para la detección de polimorfismos del gen CYP2D6 y del gen del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. (2017).
20. Ariza, Y. V., Brice, I. & Anc, F. Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética Treatment of breast cancer and pharmacogenetics. **XVIII**, (2016).
21. Dean, L. Tramadol Therapy and CYP2D6 Genotype Drug : Tramadol. 1–9 (2015).
22. Dean, L. Metoprolol Therapy and CYP2D6 Genotype Drug : Metoprolol. 1–10 (2017).

23. Dean, L. Amitriptyline Therapy and CYP2D6 and Drug Class : Tricyclic Antidepressants. 1–21 (2017).
24. Verdura Vizcaíno, E. J., Ballesteros Sanz, D. & Sanz-Fuentenebro, J. Monitorización de niveles plasma de antipsicóticos atípi-. **32**, 499–519 (2012).
25. Lenze, E. J. *et al.* Efficacy, safety, and tolerability of augmentation pharmacotherapy with aripiprazole for treatment-resistant depression in late life: a randomized placebo-controlled trial. **386**, 2404–2412 (2016).
26. Ehmann, F. *et al.* Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. *Pharmacogenomics J.* **15**, 201–210 (2015).
27. Johansen Taber, K. A. & Dickinson, B. D. Pharmacogenomic knowledge gaps and educational resource needs among physicians in selected specialties. *Pharmacogenomics. Pers. Med.* **7**, 145–162 (2014).
28. Borobia, A. M. & Sansuán, A. J. C. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica : hacia las estrategias de genotipado anticipado. **1**, 1–4 (2016).
29. Sabater-Tobella, J. Farmacogenética en la Clínica Mayo. (2017). Available at: <https://www.medicinapersonalizadagenomica.com/farmacogenetica-clinica-mayo/#.XRv27ehKjIU>. (Accessed: 2nd July 2019)
30. Bradford, L. D. A. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* **3**, 229–243 (2002).
31. Eyheramendy, S., Martinez, F. I., Manevy, F., Vial, C. & Repetto, G. M. Genetic structure characterization of Chileans reflects historical immigration patterns. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
32. Acuña, M. & Lafayette, E. Letter to the Editor Estimating genotype and allele frequencies of the CYP2D6 gene We. 6618 (2016). doi:10.1016/j.phrs.2016.04.022
33. Acuña, M. & Lafayette, E. Reply to the commentary: Estimating genotype and allele frequencies of the CYP2D6 gene. 6618 (2016). doi:10.1016/j.phrs.2016.04.013
34. Garay Cortesi, J. I. Variantes polimórficas del citocromo p450 2D6 y su influencia sobre su actividad catalítica debrisoquina 4-hidroxilasa in vivo. (2012).

35. Johanna Catalán *et al.* Metabolismo De Los Antipsicóticos: Enzimas Y Genes Relacionados. *Rev. Farmacol. Chile* **4**, 15–20 (2014).
36. Kim, S. *et al.* Clinical Pharmacogenetic Testing and Application : Laboratory Medicine Clinical Practice Guidelines. 180–193 (2017).
37. Roche. Medicina personalizada de precisión en España. (2019).
38. Hersberger, M., Marti-jaun, J. & Rentsch, K. CYP2D6 \* 6 Alleles by Tetra-Primer PCR and of the CYP2D6 \* 5 Allele by Multiplex Long PCR. **1077**, 1072–1077 (2000).
39. Kaddurah-Daouk, R. & Weinshilboum, R. Metabolomic signatures for drug response phenotypes: Pharmacometabolomics enables precision medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **98**, 71–75 (2015).
40. Alvear Tellez, J. Protección de la salud, acceso a los medicamentos y deficiencias del mercado. hacia un derecho social plurivalente en el marco de una economía social de mercado. *Rev. lus Prax.* **19**, 123–178 (2013).
41. Sigma-Aldrich. *Expand long template PCR System.* (2017).
42. Bruhn-Jensen, K. *La comunicación y los medios: Metodologías de investigación cualitativa y cuantitativa.* (2015).
43. Aguilar-Barojas, S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco* 2–7 (2005). doi:ISSN:1405-2091
44. Biblioteca del congreso nacional. Reportes estadísticos comunales. *Instituto nacional de estadísticas de Chile* (2017). Available at: <http://reportescomunales.bcn.cl/2017/index.php/Valparaíso/Población>. (Accessed: 27th March 2018)
45. Woo, J.-S. & Lu, D.-Y. Procurement, Transportation, and Storage of Saliva, Buccal Swab, and Oral Wash Specimens. *Narrat. Life Frederick Douglass* **1897**, 66–99 (2019).
46. analytikjena. Manual blackPREP Swab DNA kit. (2012).
47. Kopreski, M. S., Benko, F. A., Kwak, L. W. & Gocke, C. D. Detection of tumor

- messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1961–1965 (1999).
48. Ng, E. K. O. *et al.* mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4748–4753 (2003).
  49. Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O. & Lo, Y. M. D. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* **48**, 1647–53 (2002).
  50. Pachajoa Londoño, H. M. Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Rev. Estomatol.* **21**, 35-38 páginas (2013).
  51. Topete-González, L. R. *et al.* [Polymorphism g.37190613 G>A of the ELMO1 gene in the Mexican population: potential marker for clinical-surgical pathology]. *Cir. Cir.* **82**, 402–11 (2014).
  52. Sim, S. C. & Ingelman-Sundberg, M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics* **4**, 278–281 (2010).
  53. Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. & Roots, I. Cytochrome P450 2D6 Variants in a Caucasian Population: Allele Frequencies and Phenotypic Consequences. *Am. J. Med. Genet.* **60**, 284–295 (1997).
  54. Mapa de valparaiso. *Plataforma urbana* (2015). Available at: <http://mapa.valpo.net/mapa-valparaiso>. (Accessed: 14th June 2019)

## 8. Anexos

### Anexo 1: Acta aprobación comité bioética



CBI – Facultad de Farmacia

#### ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA N°009/2018

##### PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA AL SER HUMANO COMO SUJETO DE INVESTIGACION, EL USO DE MUESTRAS HUMANAS O DATOS PERSONALES.

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Marcela Escobar (Secretaria del CBI), Prof. María Carolina Henríquez (Miembro del CBI) y Prof. Raúl Vinet (Miembro del CBI) declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto "Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico complementario" (Versión 14.06.2018), presentado por la investigadora Alicia Caroline Junker Silva, alumna de pregrado de la Facultad de Farmacia.

Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes enviados por el investigador y que incluyen: (1) Solicitud para la aprobación de investigación que involucra al ser humano como sujeto de investigación, el uso de muestras humanas o el uso de datos personales (versión 09-2016), (2) Convenio de confidencialidad y (3) Consentimiento Informado.

*Objetivo del Estudio.* La investigación propone desarrollar un prototipo de kit de diagnóstico complementario, en caso de presencia de los polimorfismos de los alelos \*3 \*4 \*5 y/o \*6 del CYP2D6 en la comuna de Valparaíso.

*Metodología.* Se trata de un estudio descriptivo, transversal, cuantitativo que se realizará en una población de voluntarios sanos, mayores de 18 y menores de 60 años, de la comuna de Valparaíso. Comprende identificar la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 y confeccionar un prototipo de kit de diagnóstico complementario de polimorfismo genético para variantes detectadas en la comuna de Valparaíso.

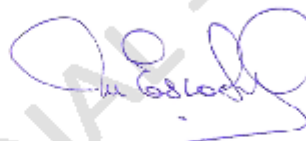
- I. El CBI considera que el objetivo general ha sido bien definido y que la metodología asociada a su logro se ha establecido adecuadamente.
- II. En la valoración bioética del proyecto, el comité considera que los derechos de los voluntarios, sus datos personales y el destino de las muestras de saliva están contemplados y resguardados a través del consentimiento informado.
- III. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia APRUEBA el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

Firman el Acta los miembros del Comité:




---

Rafael Jiménez



---

Marcela Escobar



---

Ma. Carolina Henríquez



---

Sergio Blaimont



---

Raúl Vinet

Valparaíso, 28 de junio de 2018

## Anexo 2.1: Copia consentimiento informado para investigador



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado(a): Le invitamos a participar en el estudio "Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico". El trabajo se realiza dentro del marco que exige la Universidad de Valparaíso para optar a los fondos concursables de proyectos estudiantiles 2018 de la Universidad de Valparaíso cuyo investigador principal es Alicia Caroline Junker Silva (Rut 20.682.030-6). Para que usted pueda tomar una decisión informada, le explicaré los procedimientos de la investigación, así como en qué consistiría su colaboración:

1. La investigación mencionada se realizará en la Facultad de Farmacia en 2018-2019.
2. La respuesta a los medicamentos (remedios) cambia mucho de persona a persona debido a la variabilidad genética. En este ámbito, destaca la existencia de variantes de los genes heredados para la respuesta a los medicamentos. El identificar la frecuencia de estas variantes permitiría mejorar los tratamientos en forma personalizada. El objetivo de este trabajo es el de identificar ciertas variables genéticas que provocan un metabolismo lento lo que podría conllevar a toxicidad al medicamento. Se ha seleccionado esta familia porque el metabolismo del 25% de los fármacos es a través de CYP2D6 y es altamente polimórfico lo cual afecta directamente la terapia.
3. Objetivos: Se busca compilar información de frecuencia de variantes de CYP2D6 en la comuna de Valparaíso y confeccionar un prototipo de kit de diagnóstico complementario de variantes genéticas.
4. En qué consiste su participación: su participación es voluntaria y puede elegir si quiere participar o no de este estudio, de modo que si se niega a participar no existirá ninguna consecuencia para usted. De igual manera si usted quisiera participar de este estudio puede retirarse en cualquier momento que estime conveniente, sin problemas ni sanciones. Al comienzo del estudio y por única vez, se le solicitará lavarse los dientes y enjuagarse la boca, luego se tomará una muestra de mucosa bucal mediante un hisopo (cotónito). Desde este se extraerá ADN el que se analizará para determinar la presencia de polimorfismos \*3, \*4, \*5 y \*6 del CYP2D6 que afectan la respuesta a ciertos medicamentos.
5. La toma de muestra no produce riesgos, malestar ni dolor.
6. Costos y pagos: su participación en el ensayo es gratuita y cabe destacar ninguno de los miembros del equipo encargado de este estudio recibirá pagos.
7. Derechos del participante: tiene derecho a manifestar sus dudas al investigador en cualquier momento, ya sea en el momento de la toma de muestra o al mail [alicia.junker@alumnos.uv.cl](mailto:alicia.junker@alumnos.uv.cl). Puede retirarse del estudio en cualquier momento avisando al investigador a cargo, su retiro no lo perjudicará en caso alguno.
8. Reserva de la identidad del participante: la muestra y sus datos serán registrados con un código alfa numérico lo que permite mantener anónima su identidad.
9. Confidencialidad de los datos: después del estudio las muestras serán almacenadas en una biblioteca genética de la facultad de farmacia de la Universidad de Valparaíso y podrán ser utilizadas para futuros análisis. Los datos serán cautelados por la Dra Weinstein, académico que tutela este proyecto. Utilización y Publicación de los hallazgos: los resultados del estudio serán publicados (la información confidencial no será compartida) y podrán ser utilizadas para futuros análisis.
10. Si está de acuerdo, seleccione con una "X" la(s) casilla(s) que representan las modalidades en que acepta participar. Recibirá una copia de este documento y se le informará de los resultados obtenidos y de sus consecuencias.

¿Desea participar como voluntario en el proyecto de investigación donando muestra de hisopado bucal?

SI  NO

En caso de presentar la variante, ¿permite que pueda utilizarse dicha variante como estándar de referencia contribuyendo a la elaboración del prototipo de kit de diagnóstico?

SI  NO

Nombre, apellido y firma investigador principal


Alicia Junker

Rut: 20.682.030-6 Teléfono y/o mail de contacto: [alicia.junker@alumnos.uv.cl](mailto:alicia.junker@alumnos.uv.cl).


Comité de Bioética para la  
Investigación (CBI) Facultad de

[bioetica.farmacia@uv.cl](mailto:bioetica.farmacia@uv.cl)

## Anexo 2.2: copia de consentimiento informado para participante



Universidad  
de Valparaíso  
CHILE



**FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTE**

Yo, ..... RUT ..... DECLARO que la investigador(a) principal Alicia Caroline Junker Silva estudiante de Química y Farmacia de la Facultad de Farmacia, ubicada en Avenida Gran Bretaña .Nro 1093 de la ciudad de Playa Ancha, me ha/n informado en forma completa en qué consiste la investigación "Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico complementario" que llevarán a cabo en la Facultad de Farmacia y cuáles son los procedimientos a los que será sometido/a, y en qué consistirá mi participación.

De acuerdo a lo explicado en el Consentimiento Informado, del que recibí una copia, entiendo que:

1. El objetivo de la investigación es compilar información estadística sobre polimorfismo de CYP2D6 en habitantes de la comuna de Valparaíso, a partir de esto identificar la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de Valparaíso, y confeccionar un prototipo de kit de diagnóstico complementario de polimorfismo genético para las variantes que se presenten. Se me informará el resultado de mi genotipo y sus consecuencias conocidas para la farmacoterapia.
2. Mi participación es voluntaria y consistirá en acudir por una única vez al lugar que se me indique con los dientes lavados 30 minutos antes de la toma de muestra y previo enjuague con agua, por al menos 60 segundos y luego someterme al hisopado bucal.
3. La investigación no ofrece riesgo, molestias o dolor alguno para mí.
4. Los datos obtenidos serán confidenciales, es decir, mi nombre no será dado a conocer, en su lugar, se usará un código alfa numérico y sólo podrán ser usados en alguna otra investigación cuyo objetivo no se aleje de los propósitos de este estudio.
5. Los resultados podrán ser divulgados en publicaciones de tipo académico-científicas, resguardando mi identidad. Los datos serán cautelados por la Dra Weinstein, académico que tutela este proyecto. Además, entiendo que tendré acceso a los resultados, siyo lo requiriera.
6. No recibiré remuneración alguna por participar en este estudio y tampoco tendré que asumir gasto alguno, excepto el gasto de pasaje ida y vuelta hacia el lugar de estudio en el caso de que exista.
7. Podré retirar mi participación si lo considerara necesario en cualquier momento sin que ello implique perjuicio alguno para mí
8. Si me surgiera alguna duda, podré consultarla al investigador principal, en cualquier momento de la investigación, a quien podré contactar en el mail alicia.junker@alumnos.uv.cl.
9. De acuerdo a lo declarado por mí en este documento, del que recibo una copia, firmo aceptando:

¿Desea participar como voluntario en el proyecto de investigando donando muestra de hisopado bucal

SI                       NO

En caso de presentar la variante, ¿permite que pueda utilizarse su muestra como estándar de referencia contribuyendo a la elaboración del prototipo de kit de diagnóstico?

SI                       NO

---

Nombre, apellidos y firma  
Rut: Nro.:  
Nombre y apellido Investigadores, firma, fono y mail de contacto.

Nombre, apellido y firma investigador principal  
Alicia Junker  
Rut: Nro: 20.682.030-6  
Mail: alicia.junker@alumnos.uv.cl

Comité de Bioética para la  
Investigación (CBI) Facultad de

bioetica.farmacia@  
uv.cl

### Anexo 3: convenio de confidencialidad



#### Convenio confidencialidad

La alumna Alicia Caroline Junker Silva, RUT 20.682.030-6, investigadora principal, alumno/a de pregrado que opta a los fondos concursables de proyectos estudiantiles 2018 de la universidad de Valparaíso en el marco del proyecto "Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso para desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico", junto con sus colaboradores Alvaro Enrique Bustamante Astudillo, RUT 18.568.263-3, y Daniela Isabel García Donoso, RUT 16.484.720-9, aceptan en este acto las siguientes condiciones:

Confirmando que se me ha advertido explícitamente la prohibición de divulgar, utilizar o transferir información del proyecto mencionado. Dicha prohibición se mantendrá vigente durante el plazo de duración del proyecto e incluso después de que haya concluido. La mencionada confidencialidad se refiere a todo tipo de información individual recolectada durante mi desempeño. Los resultados del estudio solo se darán a conocer en situaciones formales.

En tal virtud, acepto mantener en secreto dicha información bajo las condiciones expuestas.

Alicia Caroline Junker Silva  
Estudiante responsable

Álvaro Enrique Bustamante Astudillo  
Estudiante colaborador

Daniela Isabel García Donoso  
Estudiante colaborador

En Valparaíso, 11 de junio 2018

**Anexo 4: Mapa representativo de la localización de la toma de muestras en la comuna de Valparaíso**



Anexo 4: Mapa representativo de la comuna de Valparaíso, señalando la cantidad de muestras obtenidas de a la localidad proveniente.\*muestras de Curauma (8) y placilla (4) no fueron incluidas en el mapa <sup>54</sup>.

Anexo 5: afiche de difusión

**¡PARTICIPA EN NUESTRO PROYECTO!**

Universidad de Valparaíso CHILE

Lo invitamos a participar del proyecto de investigación «Determinación de la frecuencia de polimorfismo genético en los alelos \*3 \*4 \*5 y \*6 del CYP2D6 en la población de la comuna de Valparaíso »

Para el desarrollo de un prototipo de kit de diagnóstico complementario

Si quiere participar y ser parte de este proyecto contáctese con [alicia.junker@alumnos.uv.cl](mailto:alicia.junker@alumnos.uv.cl)

Requisito: dientes lavados antes de asistir a la cita acordada previamente.

LUGAR: SEDES UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO(PLAN)

**Anexo 6: Composición gel poliacrilamida 5%**

Reactivo	Cantidad (ul)
Solución acrilamida/N,N-Metilenbisacrilamida (29:1) 30%	1160
TAE 50%	140
Persulfato de amonio 10%	49
TEMED	3,5
Agua ultra pura	5650

Cantidad para un volumen final de 7 ml

La cámara de electroforesis fue cubierta con buffer de electroforesis (TAE 1%)

- Debido a la filtración de la solución a través de los vidrios, se utilizó vaselina sólida para adherir los vidrios

## 9. Reactivos y Equipos

### 9.1 Reactivos

BlackPREP Swap DNA kit (analytikjena, Berlin, Alemania)

Ammonium persulfate (Sigma, Japan)

N,n,n,n tetramethylenethylenediamine (sigma, China)

Acrylamide (Sigma, United kingdom)

Seakem LE Agarose (lonza, usa)

Tae buffer 50x (VWR, Solon, Ohio, USA)

Ethidium Bromide Dropper Bottler (Apex, genesse scientific, California, USA)

Nuclease Free Water (fermelo biotec, coraville, Iowa, USA)

AccuRuler 100 pb Plus DNA RTU Ladder( MaestroGen, Hsinchu,Taiwan)

100 pb DNA Ladder (new Englands Biolabs, Massachusetts, USA)

GelPilot® DNA Loading Dye, 5x (qiagen, Germany)

Gotaq green master mix (Promega,Wisconsin,USA)

Partidores \*3,\*4\*5\*6 y GAPDH (IDT,USA)

## 9.2 Equipos

Balanza granataria AND EK-610i, Arquimed

Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)

Micropipetas Lambda Plus, Corning (Genexpress, Chile)

Micropipeta pipetman p1000 (Gilson, Francia)

pcr tubes 0,2 ml flat caps, clear( biopoints Scientific, Claremont, USA)

Transiluminador ECX-20.M, Vilber Loumart (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

Fuente de poder power pac HC, galénica (BIO RAD, California, USA)

Fuente de poder BIORAD mini-pretean tetra system (BIO RAD, California, USA)

Termociclador convencional (thermal cycler PXE 5, electron corporation, equiplab)

Nanodrop (thermoscientific, Massachussets,usa)

Cámara bioseguridad clase 2 (clean bench DK-BCB001, Daiki science Co, corea del sur)