



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

LABORATORIO DE INNOVACIÓN TERAPÉUTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE ALELOS
NULOS PARA GSTM1 Y GSTT1 ASOCIADOS A EFICACIA Y SEGURIDAD DE
LA FARMACOTERAPIA DEL CÁNCER DE MAMA**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

YENNYEPHER GABRIELA ÓRDENES BARRÍA

Director de Tesis: Caroline Weinstein Oppenheimer, Ph.D.
Co-Director: Víctor Gómez Saavedra

2019

En memoria de mi ángel hermoso que está mirándome del cielo,

Mi querida Abuelita María.

AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta etapa de mi vida quisiera agradecer a los que siempre han estado conmigo, mi familia.

A mis padres Nancy y Hernán, quienes se han sacrificado y esforzado para que nunca nos falte nada. A mis hermanos Juan y Belén, a mi querido y amado Esteban. Son quienes han estado conmigo, en este largo proceso, apoyándome, entregando cariño y amor incondicional.

A mi abuelita María que ya no está en este mundo, pero que también fue parte de este proceso, por entregarme tanto amor, y ser la mejor abuelita del mundo, espero que se sienta orgullosa de mí donde quiera que esté.

A mis abuelitos por tener siempre un abrazo cariñoso y palabras de ánimo. Tíos, primos, amigos gracias por estar simplemente.

A mis compañeros y amigos que me acompañaron gran parte de este proceso, todos estos años, por su ayuda, compañía y amistad.

A cada persona que estuvo de una u otra forma ayudándome en el laboratorio para que este trabajo pudiese salir a la luz, mil gracias por cada conocimiento entregado.

A Carlos Leiva porque sin su ayuda este proyecto tampoco podría haber sido factible, con sus gestiones y apoyo, gracias.

A mis profesores Caroline y Victor por su colaboración, apoyo, paciencia y sabiduría, ya que sin ellos no podría haber llegado a cumplir una de mis grandes metas, gracias por sus constantes consejos y palabras de aliento.

Agradecer una vez más a mi mamá por ser todo en mi vida, por entregarme los valores y enseñarme que nada es imposible. Te amo mamá.

A todas las personas que he nombrado son los que han compartido conmigo este largo proceso y agradezco a Dios que los haya puesto en mi camino y permitiera conocerlos, y espero seguir teniéndolos en mi vida.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Cáncer en el mundo	1
Cáncer de mama en el mundo	1
Cáncer de mama en Chile	2
Características generales del cáncer de mama.....	3
Clasificación cáncer de mama.....	3
Variabilidad en la respuesta a la terapia.....	6
Quimioterapia del cáncer de mama.....	7
Glutación S-transferasa.....	8
Antraciclina y taxano como droga diana para GST	10
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Características del estudio.....	15
2. Materiales y equipamiento	15
3. Almacenamiento y procesamiento de muestras	16
4. Diseño experimental	16
5. Extracción de ADN.....	17
6. Detección de genes y sus variantes	17
6.1 Partidores	17
6.3 Gen constitutivo.....	18
6.4 GSTM1 y GSTT1	18
6.5 Límite de detección.....	18
RESULTADOS.....	19
1. Aislamiento del ADN	19
2. Calidad de ADN	19

3. Amplificación de GSTM1	20
3.1 Límite de detección para GSTM1	22
4. Detección de la variante GSTT1	22
4.1 Límite de detección para la variante GSTT1	24
5. Frecuencia de genotipos para GSTM1 y GSTT1	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS	33
ANEXOS	39
Anexo N°1	39
Anexo N°2	41
Anexo N°3	42

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud señala que el principal problema de salud en la mujer es el cáncer de mama, siendo la primera causa de muerte a nivel mundial. La mortalidad cáncer de mama ha disminuido, debido a la detección precoz y un tratamiento inicial efectivo. Este último se basa principalmente en quimioterapia guiada por perfiles de genotipificación del tumor, sin considerar la genética del paciente y su influencia sobre la farmacocinética y farmacodinamia del fármaco. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo implementar metodologías moleculares para la detección de los alelos nulos de GSTM1 y GSTT1 con el fin de complementar la decisión de la farmacoterapia de inicio en el cáncer de mama. Para ello se extrajo ADN genómico de 30 voluntarias sanas, se implementó la metodología de detección de estos genes por reacción en cadena de la polimerasa para luego visualizar sus amplicones, usando la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Además se determinó el límite de detección para la metodología propuesta. Se logró implementar la metodología con un límite de detección de 1 pg de material genético y se determinó una frecuencia para los alelos nulos GSTM1 y GSTT1 de 33 y 27%, respectivamente, en la población estudiada. Estos resultados podrán validarse con estudios clínicos futuros para incluir a GSTM1 y GSTT1 como marcadores en un panel genético para decidir la terapia inicial de cáncer.

ABSTRACT

The World Health Organization indicates that in women the main health problem is breast cancer, being the leading cause of death worldwide. Breast cancer mortality has been reduced, but not its incidence, due to early detection and effective initial treatment. The latter is based mainly on chemotherapy guided by tumor genotyping profiles, ignoring the patient's genetics and its influence on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drug. Therefore, this research was aimed to implement molecular methodologies for the detection of null alleles for GSTM1 and GSTT1 in order to complement the initial pharmacotherapeutic decision in breast cancer. For this, genomic DNA was extracted from 30 healthy volunteers, and the methodology for detection of these genes by polymerase chain reaction was implemented in order to subsequently visualize amplicons, using the agarose gel electrophoresis technique. In addition, the detection limit for the proposed methodology was determined. The methodology was implemented with a detection limit of 1 pg of genetic material and it was determined a frequency for the null alleles GSTM1 and GSTT1 of 33 and 27%, respectively on the studied population. These results might be validated with future clinical studies to include GSTM1 and GSTT1 as markers within a genetic panel to decide the initial cancer therapy.

INTRODUCCIÓN

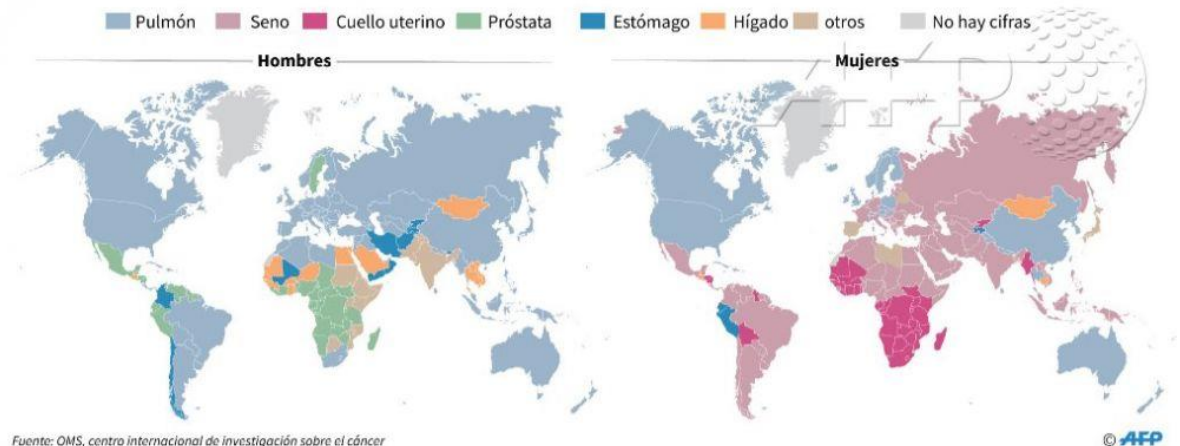
Cáncer en el mundo

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2018 se estimó que hubo 18 millones de nuevos casos, y 9,5 millones de defunciones, para ambos sexos y todas las edades ⁽¹⁾.

Los cánceres que causan un mayor número de muertes al año son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama ⁽¹⁾. En la Fig. N°1 se representa la primera causa de muerte a nivel mundial para ambos sexos.

Tipos de cáncer que causan más muertes en el mundo

Por país y por sexo en 2018



Fuente: OMS, centro internacional de investigación sobre el cáncer

© AFP

Fig. N°1. Casuística de cáncer en el mundo. Un hombre de cada 5 y una mujer de cada 6 en el mundo desarrollarán un cáncer durante su vida, mientras que uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres morirá de esta enfermedad ⁽¹⁾.

Cáncer de mama en el mundo

Según estimaciones de GLOBOCAN 2018, se diagnosticaron 2,1 millones de casos de cáncer de mama en mujeres, representando casi 1 de cada 4 casos en el sexo femenino, con una tasa de incidencia de 46,3 por 100 mil mujeres. Además es la causa principal de muertes en mujeres, con una estimación de 626 mil defunciones por esta causa ⁽²⁾. En la Fig. N°2 se representa la frecuencia de los distintos cánceres que causaron muertes en mujeres a nivel mundial en 2018.

Estimated number of deaths in 2018, worldwide, all cancers, females, all ages

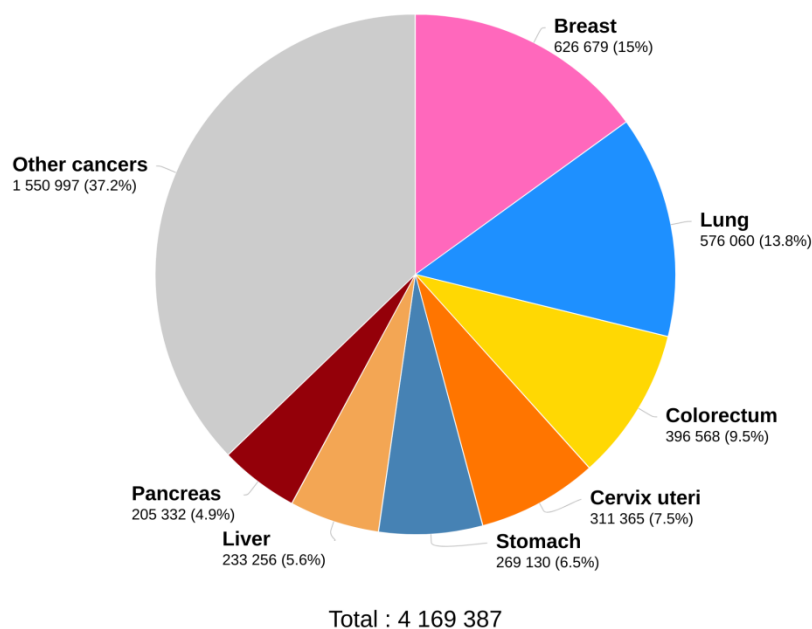


Fig. N°2: Distribución estimada del número de muertes por diferentes tipos cáncer en 2018, en mujeres ⁽²⁾.

Cáncer de mama en Chile

En Chile, el cáncer constituye la segunda causa de muerte de la población. El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres chilenas con una mortalidad de 16,6 por cada 100.000 mujeres. En 2018 se registraron 1511 muertes por cáncer de mama, registrándose las tasas más altas de incidencia por esta causa. Según estudios la mortalidad por cáncer de mama en mujeres aumenta progresivamente con la edad, lo que sería asociado al envejecimiento, siendo más pronunciada en el grupo de 80 años y más, considerándose la edad su principal factor de riesgo. ⁽³⁻⁵⁾.

A pesar de este panorama poco alentador se ha observado, en países desarrollados, una disminución en la mortalidad por cáncer de mama, gracias a una detección temprana y tratamientos efectivos. Sin embargo, al mismo tiempo el tratamiento es uno de los problemas más importantes que circundan a las pacientes con cáncer de mama. Esto se debe a que las drogas aprobadas para tratar este tipo de cáncer, al igual que la mayoría de las drogas antineoplásicas, son extremadamente tóxicas, la gran mayoría de alto precio y su utilización depende muchas veces del estado de avance de la enfermedad. La toxicidad causada por estos fármacos es uno de los factores más importantes para el control de la enfermedad, ya que muchas veces repercuten en la calidad de vida de los pacientes, causan un aumento de hospitalizaciones y abandono de la

terapia. Cabe destacar, que la gran mayoría de estas reacciones adversas y su intensidad, depende de un componente idiosincrático, por lo tanto, una misma droga en dos individuos puede causar efectos diferentes, lo que se denomina variabilidad en la respuesta a fármacos. ⁽⁶⁻⁸⁾

Características generales del cáncer de mama

El cáncer de mama está conformado por un grupo de neoplasias malignas que tiene su origen en la proliferación acelerada a causa de la pérdida del control del ciclo celular por alteración en al menos uno de los siguientes genes: BRCA1, BRCA2, p53 y PTEN, y en otros casos por razones desconocidas. Puede estar localizado a nivel de los ductos o lobulillos siendo el ductal el más frecuente. El término “carcinoma in situ” se refiere al tipo de cáncer que se encuentra confinado en la luz de los ductos o lobulillos glandulares, sin invadir los tejidos vecinos. Por su parte, el carcinoma invasivo prolifera hasta romper la llamada membrana basal y extenderse infiltrando los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, penetrando así el tejido circundante. ⁽¹⁰⁾

Clasificación cáncer de mama

Se manejan diferentes clasificaciones:

- Sistema TNM se basa en la clasificación por tamaño del tumor (T), si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos (N), y si el tumor ha pasado a procesos metástasis (M) ⁽¹¹⁾.
- De acuerdo a los patrones de expresión génica, que se relacionan con el pronóstico o con el riesgo de metástasis, se clasificó el cáncer de mama en 2 grandes grupos, basados en la positividad para el receptor de estrógeno: i) neoplasias de bajo grado, para aquellas que expresan receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y ii) neoplasias de alto grado que no presentan RE y RP, pero en las cuales hay sobreexpresión y/o amplificación de HER2. ⁽⁴⁶⁾
- Receptor de estrógeno positivo: Los tumores luminales fueron clasificados en tres grupos: Luminal A (RE o RP positivos, HER2/neu negativo, y bajo índice de proliferación), Luminal B (RE o RP positivos, HER2/neu negativo e índice de proliferación alto), el tercer grupo fue denominado Luminal HER2/neu positivo.
- Recetores de estrógeno negativo: Basal, HER2/neu, basal like. ⁽⁴⁶⁾.

Los tumores luminales tiene receptores hormonales positivos, los HER2 expresión de HER2 y los basal like o triple negativos no expresan ni receptores hormonales ni HER2. El subtipo Luminal A es el de mejor pronóstico y el basal like el de peor pronóstico. ⁽⁴⁵⁾

EL subtipo basal fue denominado como triple negativo por ser RE negativo, RP negativo y HER2/neu negativo. Es un subgrupo que expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina y laminina. Los datos clínicos actuales muestran que es el subtipo más agresivo, cuya sobrevida total y libre de enfermedad es baja, debido a que las terapias endocrinas y con trastuzumab son ineficaces en este grupo de tumores.

Subtipo de sobre-expresión de HER2/neu corresponde entre el 10 a 15% de los cánceres de mama y sobre-expresa genes ubicados en el cromosoma 17q. Incluyen el gen del EGFR-2 (ERBB2) y el growth factor receptor bound protein 7 (GRB7), además de sobreexpresar genes de proliferación y presentar escasos genes asociados al fenotipo luminal. El ERBB2 es un proto-oncogen que cuando está sobre-expresado (amplificado), se asocia con caracteres histopatológicos asociados a mal pronóstico, a un alto grado histológico, baja expresión de RE y RP, además de mala respuesta a terapia. Este subtipo corresponde a la mitad de los cánceres de mama que son HER2/neu positivos. ⁽⁴⁶⁾ En la Figura N° 3 se puede ver los subtipos de cáncer de mama determinados por perfiles de expresión génica y su comportamiento.

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (-)	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico. • Bajo grado histológico. Respuesta hormonal. • Asociado a incremento de edad.
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Similar al Subtipo Luminal A. • Peor resultado que el Subtipo Luminal A. • Más frecuentemente RE (+)/RP (-).
Basal	RE (-); RP (-); HER2/neu (-) CK 5/6 (+) y/o EGFR (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo agresivo. • Alto grado histológico e índice mitótico. • Riesgo en edades menores (<40 años). • Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.
HER2/neu (+); RE (-)	RE (-); RP (-); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Menos común. Subtipo altamente agresivo. • Alto grado histológico. • Riesgo en mujeres <40 años, mayor que el subtipo luminal. • La etnia afroamericana puede ser un factor de riesgo. • Resultado mejorado por HER2/neu (+).

Fig. N°3: Subtipos de Cáncer de mama determinados por perfiles de expresión génica ⁽⁴⁶⁾.

Actualmente mediante la identificación de receptores hormonales se determina si las células cancerosas pueden responder a un tratamiento en particular.

En la figura N°4, se muestra un protocolo de manejo de pacientes con cáncer de mama del INC del 2013 donde se indican las opciones de tratamiento para estos pacientes, estratificándolo en no invasivo, localmente diseminado y metastásico. ⁽¹⁰⁾

La terapia local tiene como objetivo tratar el tumor en un sitio específico, sin afectar el resto del cuerpo. La cirugía y la radioterapia son ejemplos de terapia locales. ⁽¹⁰⁾

La terapia sistémica se administra por vía oral o directamente en el torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas que se hayan podido propagar más allá del seno. La quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia son terapias sistémicas. ⁽¹⁰⁾

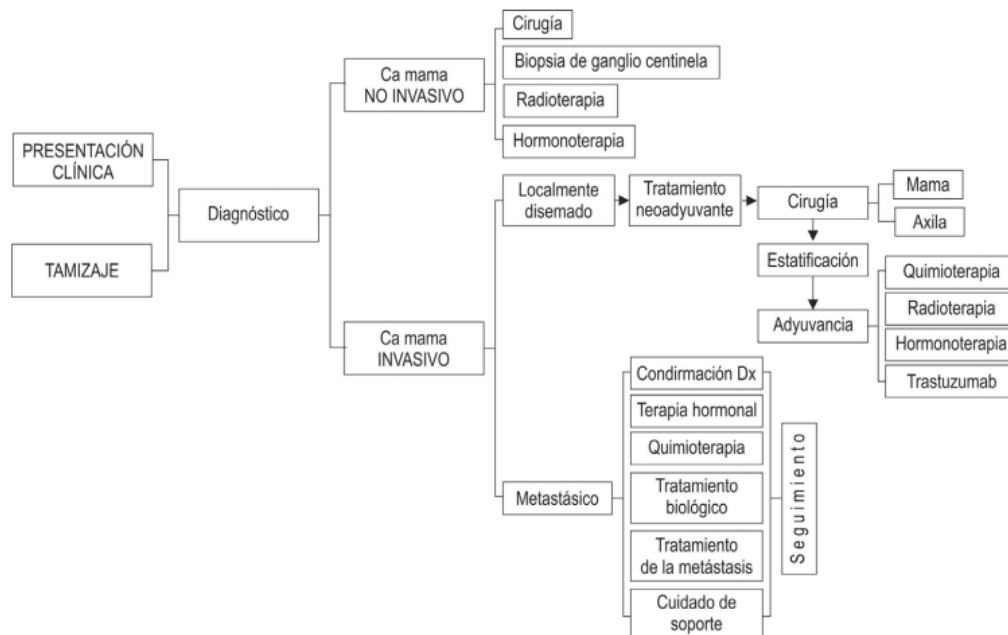


Fig. N°4. Protocolo de manejo general en pacientes con cáncer de mama. INC, 2013 ⁽¹⁰⁾.

La enorme variabilidad interindividual existente en la eficacia y toxicidad de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama se ha incorporado en el análisis y debate farmacoterapéutico actual. Muchas variables han sido asociadas a la respuesta a fármacos una de ellas las diferencias genéticas interindividuales en el transporte, metabolismo y dianas de ciertas drogas las que pueden una enorme influencia sobre el éxito o fracaso de un tratamiento determinado ⁽⁹⁾.

Variabilidad en la respuesta a la terapia

En la actualidad el manejo del tratamiento inicial del cáncer de mama, requiere de un grupo multidisciplinario de acciones que va desde la cirugía de mama, la radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa) y la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares. También es acompañado de la identificación de genes, oncogenes expresados en el tumor que guían la decisión en la terapia inicial para tratar el cáncer. ^(12, 13)

En el tratamiento del cáncer de mama, al igual que en otras terapias, se observa que existe una heterogeneidad significativa en la eficacia y toxicidad de los agentes quimioterápicos entre las distintas poblaciones humanas. La administración de la misma dosis de un cierto agente a una población de pacientes da lugar a un amplio abanico de toxicidades. ⁽¹⁴⁾

Muchas variables clínicas han sido asociadas con la respuesta al fármaco (edad, género, dieta, función orgánica, biología del tumor), las diferencias genéticas, pueden tener también un gran impacto en la misma. Además de la tolerancia reducida a la quimioterapia, los determinantes genéticos pueden afectar también la respuesta al fármaco y la supervivencia del paciente. La identificación de razones genéticas subyacentes en los problemas de toxicidad o falta de respuesta del tumor, reducirán de forma importante la frecuente imprevisibilidad del tratamiento anticancerígeno. Cabe recordar que una droga administrada a un paciente será objeto de procesos tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción, todos comandados por proteínas, ya sean en forma de transportadores o enzimas, las cuales tienen un componente genético indudable. ^(12,14)

La farmacogenómica es la disciplina que estudia las variaciones a nivel de la secuencia del ADN y que son las responsables de las variantes en la función de proteínas que están implicadas en la respuesta de distintos pacientes ante un mismo fármaco, lo que se denomina variación interindividual. Se ha demostrado que gran parte de esta variación está causada por polimorfismos genéticos en diferentes enzimas que metabolizan los fármacos. Existen variantes de un solo nucleótido o nucleótido simple (SNPs) que afectan la actividad de proteínas que modulan la eficacia y toxicidad de fármacos. Estos son muy numerosos, estables y están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Algunos de estos presentan una mayor variación en el genoma humano, considerándose polimórficos. Aproximadamente el 90% de la variabilidad genética humana es atribuible a los SNPs entre ellas inserciones, deleciones, sustituciones, aunque también existen translocaciones y duplicaciones (que generan un aumento en el número de copias). Además, más del 90% de los genes humanos contienen al menos un SNP, pudiendo encontrarse estos tanto en un exón como en un intrón. Estos polimorfismos se consideran de gran interés ya que generan diferencias en la

estructura de las proteínas, explicando el desarrollo de enfermedades y la aparición de fenotipos diferentes que pueden afectar la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos ^(15,16).

Estos polimorfismos a menudo causan que los humanos se dividan según las variantes que presenten, en 4 fenotipos diferentes ⁽¹⁷⁾:

- metabolizadores pobres: carecen de la enzima funcional.
- metabolizadores intermedios: heterocigoto para un alelo deficiente o portadores de dos alelos que causan actividad disminuida.
- Metabolizadores “extensivos”: poseedores de dos alelos normales
- Metabolizadores ultrarrápidos: poseedores de múltiples copias del gen, trato que se hereda de forma dominante

Ante una dosis normal, en el caso de los metabolizadores lentos, el efecto del fármaco puede ser excesivo o incluso tóxico, debido a que como consecuencia de su lento metabolismo se acumula durante demasiado tiempo en el organismo. Por el contrario, en el caso de los metabolizadores ultrarrápidos, el fármaco es procesado por el organismo tan rápido que no llega a ejercer su efecto beneficioso, lo que hace necesario plantear otro tratamiento o incrementar la dosis. ^(17, 18)

Esto, en conjunto con los datos aportados anteriormente, da pie a que un estudio genético previo a la elección de un tratamiento oncológico permitiría seleccionar la terapia más segura y eficaz

Quimioterapia del cáncer de mama

Los tumores localizados positivos para los receptores de estrógenos se tratan con antiestrógenos (ej.tamoxifeno) y los inhibidores de la aromatasa (ej.anastrozol, exemestan, letrozol). En cambio aquellos tumores más avanzados o que presentan metástasis son tratados con quimioterapia citotóxica, principalmente taxanos (paclitaxel y docetaxel). Esta variedad de tratamientos, plantea la necesidad de llevar a cabo un estudio del paciente previo a la selección del tratamiento, en el cual la farmacogenómica se revela como una alternativa de enorme interés. ⁽¹⁹⁻²¹⁾

Los protocolos de quimioterapia para cáncer de mama que se emplean actualmente son:

- CMF : ciclofosfamida, metotrexato, y 5-FU.
- CAF (o FAC): ciclofosfamida, doxorrubicina (DOX) y 5-FU.
- AC : doxorrubicina y ciclofosfamida.
- EC : epirubicina y ciclofosfamida.
- TAC : docetaxel, doxorrubicina y ciclofosfamida.

- AC → T : doxorubicina y ciclofosfamida seguida de paclitaxel o docetaxel. Trastuzumab (Herceptin) se puede administrar con el paclitaxel o el docetaxel para tumores HER2/neu positivos.
- A → CMF : doxorubicina, seguida de CMF.
- CEF (FEC) : ciclofosfamida, epirubicina y 5-FU (a esto le puede seguir docetaxel).
- TC : docetaxel y ciclofosfamida.
- TCH : docetaxel, carboplatino, y trastuzumab, para tumores HER2/positivos ⁽¹⁰⁾.

En pacientes que han recibido terapia previa (adyuvante o anti-metastásica) con atraciclinas o taxanos y que no necesiten poliquimioterapia, se puede usar monoterapia con capecitabina, vinorelbina o eribulina. Otros agentes incluyen: gemcitabina, platinos, taxanos y antraciclinas liposomales. Las decisiones terapéuticas se efectúan caso a caso según: perfil de toxicidad , exposición previa, preferencia del paciente y disponibilidad de la droga. ⁽⁶⁾

Glutación S-transferasa

GST, una súper familia de enzimas metabólicas de fase II, juegan un rol importante en la detoxificación de moléculas endógenas y exógenas (ambientales) por conjugación de compuestos electrófilos que reaccionan con glutatión. ⁽²²⁾

Los sustratos pueden ser mutágenos, carcinógenos, contaminantes ambientales, fármacos y algunos compuestos endógenos. Es una enzima altamente polimórfica, lo que se ha asociado con el riesgo de toxicidad y la eficacia de la terapia del cáncer. ⁽²³⁾

Una vez en el interior de la célula las drogas pueden ser inactivadas por oxidación y/o conjugación con glutatión (GSH). La sobreexpresión de GSTs y el aumento del contenido celular de GSH se han asociado con la resistencia a un agente muy importante en el tratamiento de varios cánceres, el cisplatino, y también con antraciclinas y agentes alquilantes como la ciclofosfamida. ⁽²⁸⁾ Estos dos últimos son drogas que se usan en los esquemas de tratamiento del cáncer.

La conjugación no es suficiente para que la célula expulse los fármacos, ya que el conjugado (GS-X) es más hidrófilo y no puede salir por difusión pasiva. Para ello el GS-X necesita a las llamadas bombas de GS-X (“GS-X pumps”). Algunas proteínas transportadoras como la MRP pueden actuar como bombas de GS-X. Otra de estas proteínas, la Pgp, parece tener elementos reguladores comunes con la GST-pi, habiéndose descrito un aumento de la expresión de ambas en tumores resistentes y en tumores con baja actividad proliferativa. ⁽²⁹⁾

Existen dos superfamilias de genes que codifican para enzimas con actividad GST, una para las formas citosólicas y la otra para las que se expresan en membranas celulares. Los miembros de la familia soluble de GST se presentan en la Fig. N°5 Se ha descrito polimorfismo genético para varios miembros de la familia soluble de GST, aunque los más estudiados son mu (GSTM), theta (GSTT) y pi (GSTP).⁽⁵⁰⁾ Esta tesis se enfocó en dos formas solubles llamadas GSTM1 y GSTT1.

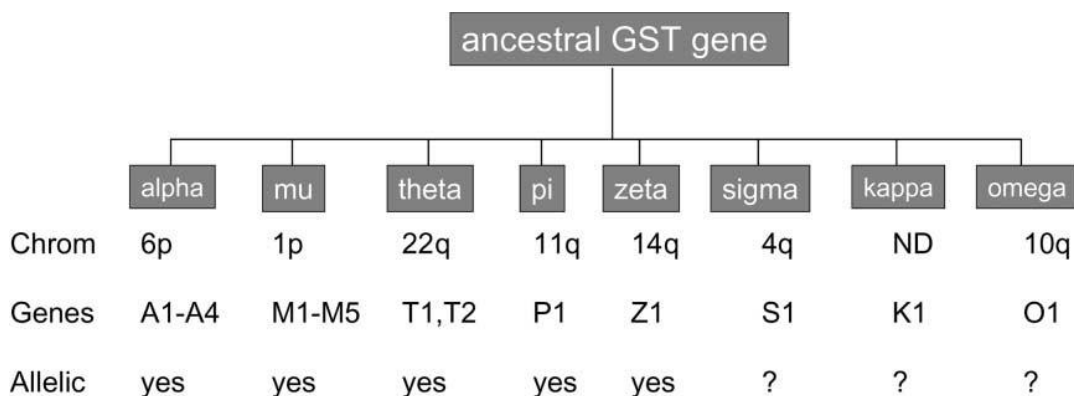


Fig. 5. Superfamilia de genes GST de expresión en citosol. Se presenta el cromosoma en que se ubica, el gen y la existencia de polimorfismo genético.⁽⁵⁰⁾

La familia GST mu (GSTM)

Los cinco miembros de la familia GSTM, GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3 se encuentran ubicados en tándem en el cromosoma 1p13.3. Se han identificado tres alelos para GSTM1; GSTM1*A, GSTM1*B, GSTM1*0. La delección completa del alelo corresponde a GSTM1*0 y los individuos homocigotos no pueden producir la proteína GSTM1 y se denominan genotipo nulo para GSTM1. La frecuencia de esta última es de 50 % en caucásicos, pero puede llegar hasta más de 60 % en otras poblaciones. Por otra parte, los alelos *A y *B difieren en una sola base en el exón 7 de la proteína y codifican formas activas de la enzima.⁽⁵⁰⁾

La familia GST theta (GSTT)

Se han descrito dos miembros en esta familia GSTT1 y GSTT2 que se encuentran ubicados en el cromosoma 22q11.22, separados por 50 kb. GSTT1 puede presentar una delección denominada GSTT1 *0, que corresponde a un alelo no funcional^{(24) (50)}. En caucásicos la frecuencia de este alelo sería de 20 %.⁽²³⁾

En síntesis, los alelos *0 para GSTM1 y GSTT1 están asociados con una disminución de la actividad de la enzima GST, lo que altera la toxicidad a la quimioterapia en pacientes con leucemia aguda, cáncer de mama y cáncer

colorrectal metastásico ⁽²⁴⁾. También es interesante considerar que algunas quimioterapias ejercen su efecto antineoplásico al generar productos reactivos de oxígeno (ROS) y derivados de estos que también son metabolizados por diferentes enzimas como GSTT1 y GSTM1. Debido a que estas son la causa inmediata de la muerte de las células tumorales, los niveles de especies reactivas que alcanzan las células tumorales y tienen efectos citotóxicos directos o desencadenan vías apoptóticas intracelulares, es probable que la actividad de estas enzimas tenga un impacto en la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, la variabilidad interindividual en las enzimas GST también puede tener un impacto significativo en la eficacia del tratamiento. ^(24, 26)

Antraciclinas y taxanos como drogas diana de GST

Las antraciclinas son uno de los citostáticos más potentes de los que se dispone hoy en día. Estas moléculas se intercalan entre las bases del DNA formando un complejo que inhibe la enzima DNA-topoisomerasa II alfa impidiendo así la síntesis tanto de DNA como de RNA. Además, cuando estos fármacos son metabolizados aparecen radicales libres que son especies reactivas de oxígeno tóxicas para las células, por lo que el mecanismo de acción del fármaco no parece limitado exclusivamente a la inhibición de topoisomerasa II alfa. ⁽³¹⁾ La adriamicina (DOX) es una de las drogas más efectivas para el tratamiento de tumores sólidos, como el carcinoma de mama, el carcinoma de células pequeñas de pulmón o el carcinoma de ovario ⁽³⁰⁾. En el cáncer de mama avanzado se emplea, comúnmente, la combinación ciclofosfamida, DOX y 5-fluorouracilo, ya que ha demostrado mayor eficacia que el régimen clásico de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo. Si bien, es cierto, que la toxicidad del primero es mayor, la combinación taxanos, DOX, ciclofosfamida se considera más potente que la primera aunque la toxicidad medular es también mayor. ⁽³¹⁾

El metabolismo de la DOX también conduce a la producción de ERO a partir de la cadena lateral del grupo carbonilo del carbono 13 que se convierte en un grupo •OH por acción de la aldoceto reductasa. Esta transformación da lugar a un alcohol secundario (doxorubicinol) que puede liberar el Fe₃₊ de la aconitasa citoplasmática, y provocar la alteración de su metabolismo y generar un EO. ⁽⁴⁸⁾

Por otra parte, es importante tener en cuenta que el corazón es muy rico en mitocondrias y la DOX tiene la capacidad de modificar la composición química, estructura y función de las membranas biológicas, principalmente a nivel mitocondrial, debido sobre todo a la peroxidación lipídica (POL) generada por este medicamento. Todos los mecanismos oxidativos descritos anteriormente son desencadenados por la DOX para inducir la muerte de células cancerígenas, y a la vez son responsables de los efectos tóxicos que tienen lugar en los cardiomiocitos. ⁽⁴⁸⁾

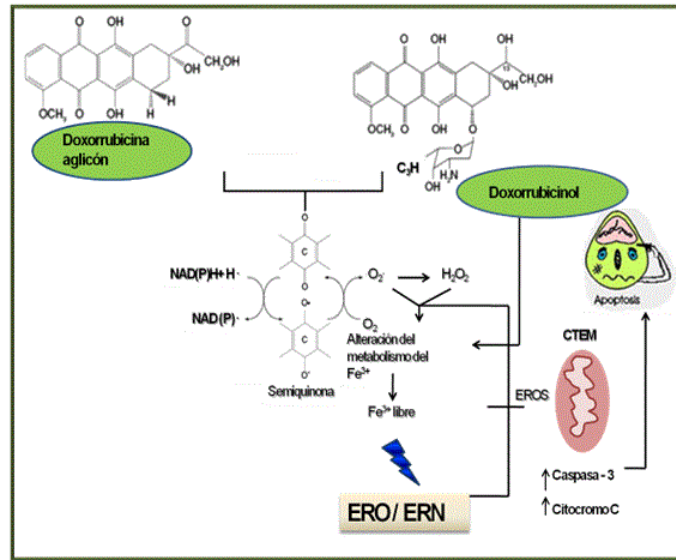


Fig. N° 6: Mecanismos cardiotoxícos de la doxorubicina mediados por la generación de especies reactivas de oxígeno. Estos mecanismos conllevan a la disfunción mitocondrial y disparo de la apoptosis celular por aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno. CTEM: cadena de transporte de electrones mitocondrial; ERO: especie reactivas de oxígeno. ⁽⁴⁸⁾

Entre los efectos secundarios de las antraciclinas cabe de destacar la toxicidad gastrointestinal, alopecia, mielosupresión, inducción de segundas neoplasias hematológicas y, sobre todo la cardiotoxicidad. Las antraciclinas producen una miocardiopatía tóxica que es dependiente de dosis, por lo que nunca debe sobrepasarse un umbral de dosis acumulada, ya que a partir de dicho umbral aparece insuficiencia cardíaca congestiva en cerca de un tercio de los casos. Lamentablemente, incluso sin alcanzar dicha dosis acumulada, el corazón de las mujeres tratadas con antraciclinas sufre un daño funcional y orgánico que, aún sin traducirse en clínica cardíaca a corto plazo, compromete la salud del corazón de las enfermas a largo plazo. ⁽³¹⁾

El docetaxel es un taxoide semisintético obtenido a partir de las hojas del tejo europeo. Su principal mecanismo de acción consiste en promover la polimerización de microtúbulos, estabilizando los haces con la consiguiente paralización de la mitosis. ⁽⁴⁷⁾ Así, queda bloqueado el ciclo celular en la transición metafase-anafase induciéndose la apoptosis. El docetaxel se considera, actualmente, un fármaco indispensable en el tratamiento del cáncer de mama, tanto en la enfermedad metastásica como localmente avanzada y operable. Como toxicidades más importantes presenta: neutropenia, reacciones de hipersensibilidad, neurotoxicidad, diarrea, vómitos, toxicidad sobre piel y anexos, mucositis y retención hídrica con desarrollo de derrame pleural, pericárdico o ascitis. ⁽³¹⁾

Dado que, tanto drogas oncológicas derivadas de antraciclinas como de taxanos, ambas de reconocida toxicidad tanto tumoral como metabólica del organismo, son utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama ⁽⁴⁸⁾ y que un desequilibrio en el metabolismo del fármaco impone un riesgo para la sobrevida del paciente, es que esta tesis se centró en adaptar metodologías descritas en la literatura para detectar variantes nulas GSTT1 y GSTM1, aportando con una herramienta adicional para el screening farmacogenómico que permita complementar la decisión de la terapia farmacológica inicial en cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Dada las frecuencias descritas en la literatura para los alelos nulos de GSTM1 y GSTT1, 50 y 20%, respectivamente, será posible su detección en voluntarias sanas (n=30), usando metodología descrita en la literatura.

OBJETIVOS

General

Establecer metodologías para la detección de alelos nulos de genes de la superfamilia de la glutatión S transferasa.

Específicos

Adaptar protocolos descritos en la literatura para amplificar segmentos génicos de GSTM1 y GSTT1.

Calcular las frecuencias génicas de las variantes nulas de GSTM1 y GSTT1 en voluntarias sanas.

Determinar el límite de detección para las metodologías implementadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Características del estudio

Esta investigación está enmarcada en un proyecto UVA 1402 adjudicado. Fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Farmacia (**Anexo 1**).

Se realizó un estudio prospectivo que contó con la participación de 30 voluntarias sanas, mayores de 18 años que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión (**Anexo N°2**) y firma del consentimiento informado (**Anexo N°3**). La muestra se estimó para obtener una población genotípicamente representativa y evaluar el desempeño de las técnicas de biología molecular. Las participantes provinieron de distintos lugares de la región de Valparaíso y fueron convocadas a través de un afiche de difusión (**Anexo N°4**). Por otra parte, la identidad de las participantes y los resultados del estudio fueron mantenidos bajo estricta confidencialidad.

A las voluntarias no se les administró ningún fármaco ni alimento y tampoco fueron sometidos a algún dispositivo, radiación o procedimientos quirúrgicos. Solamente se extrajo 4 mL de sangre venosa. La muestra fue depositada en tubos vacutainer provisto con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, ya que no presenta interferencias con los procesos analíticos ni moleculares. Esta fue utilizada en la implementación del método de biología molecular. Las muestras fueron extraídas en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso por un técnico paramédico en una sala habilitada para la atención de pacientes.

2. Materiales y equipamiento

Para todos los procedimientos de amplificación se utilizó Redtaq Ready mix Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA, provista con 0.06 unidades/uL de ADN polimerasa Taq y colorante inerte, 20 mM Tris-HCl (pH 8,3) con 100mM de cloruro de potasio, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, TTP) estables, cloruro de magnesio 3 mM, 0,002% de gelatina, provista para 20 reacciones y 1,5 mL de agua PCR Reagent. El termociclador de tiempo final usado correspondió al modelo PXE05 de Thermo, Milford, MA, USA. Los partidores fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, USA y sus secuencias se presentan en la (**Tabla N°2**).

Los geles de agarosa fueron elaborados en buffer Tris-Acetato-EDTA 1% (TAE) (Bio-Rad, California, USA) y fueron visualizados en un gel de agarosa (Lonza, Basel, Suiza) en presencia de bromuro de etidio (Apex, Indore Road, Ujjain) y transluminador UV (Vilbert Lourmat, Collegien, Francia). En todos los geles se ocupó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega,

Wisconsin, USA). Las cámaras de electroforesis horizontal y la fuente de poder son de la marca Bio-Rad, California, USA ⁽³⁴⁾.

3. Almacenamiento y procesamiento de muestras

La sangre se mantuvo en los tubos Vacutainer en cadena de frío hasta su procesamiento. Se separó de los tubos Vacutainer lo más pronto posible 200 uL de sangre entera, la que se depositó en un tubo de 1,5 mL estéril e inmediatamente se hizo el procesamiento de extracción de ADN, la que se guardó a -20°C hasta su utilización.

4. Diseño experimental

En la figura N°5 se esquematiza el diseño experimental utilizado en el desarrollo de esta investigación, que básicamente consistió en el reclutamiento de las voluntarias, obtención de ADN a partir de su sangre y aplicación de las metodologías moleculares para amplificar los genes de interés. Luego, se analizó los resultados obtenidos para detectar a las voluntarias que presentaran las variantes nulas. Para estas metodologías se definió el límite de detección.

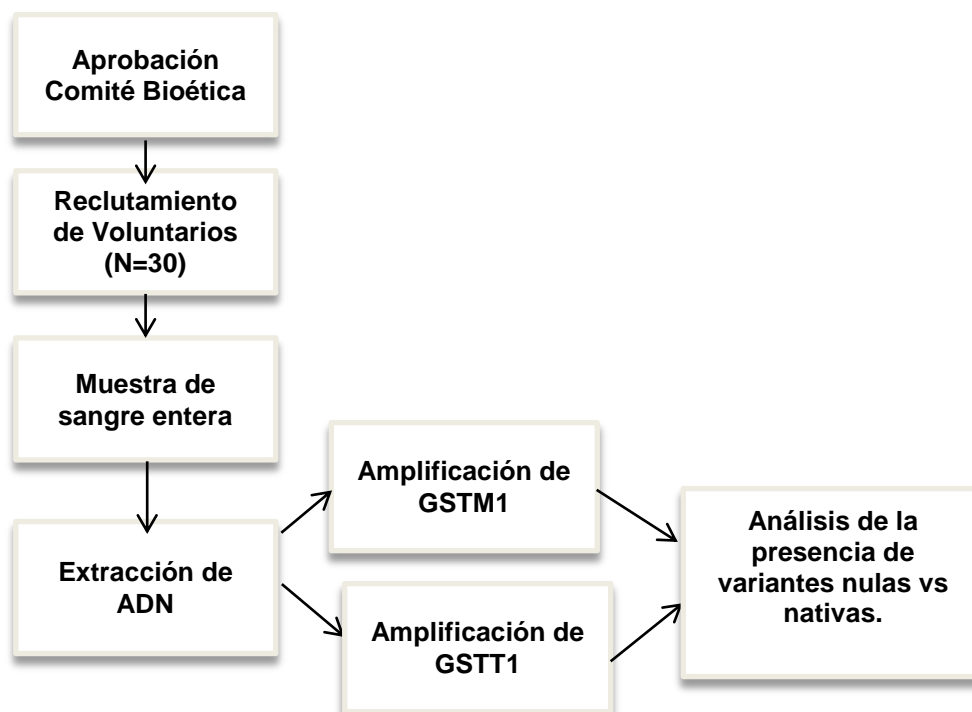


Figura N°5: Diseño del estudio

5. Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de sangre total mediante el kit comercial QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El método de extracción se basa en la interacción del ADN con una matriz sólida, provista en una columna de separación (cromatografía de adsorción), gracias a la adición de una sal caotrópica (cloruro de guanidina) que disminuye su interacción con moléculas acuosas aumentando su afinidad por la columna. El protocolo resumido será el siguiente: a 200 µL de sangre entera anticoagulada con EDTA se adicionaron 20µL de proteinasa K, 200 µL de buffer de lisis y se mantuvo a 56°C en un baño seco (Thermomix, Eppendorf) por 10 min. Posteriormente, se agregó 200 µL de etanol y se aplicó la mezcla a la columna de aislamiento, luego se añadió 500 µL de buffer de lavado (x2), y finalmente 200 µL de buffer de elución ^(35,36).

Para comprobar la calidad del material obtenido se determinó la pureza (absorbancia 260 nm/ 280 nm y 260 nm/ 230 nm) y la concentración (absorbancia 260 nm) usando un espectrofotómetro Nanodrop (ThermoScientific, Massachusetts, USA). Además, se evaluó la integridad del ADN por amplificación del gen constitutivo GAPDH en gel de agarosa al 2% p/v a y a 75 v en la electroforesis. ⁽³⁷⁾.

6. Detección de genes y sus variantes

6.1. Partidores

Los partidores para GAPDH humano fueron diseñados previamente en el laboratorio utilizando el software AMPLIFIX. Los partidores para los genes GSTM1 y GSTT1 fueron obtenidos de la literatura ⁽³⁸⁾. Las secuencias de los partidores 1 y 2 se presentan en la **Tabla N°2**

6.2 Gen constitutivo

Se usó la siguiente mezcla de reacción: 25 uL Redtaq Ready mix, 2,5 uL de cada partidor descrito en la **tabla N°2**, 100 ng ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 50 uL. 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 45s, y una extensión final de 5 min a 72°C. Una banda visualizada en un gel de agarosa 2% p/v cercana a 283 pb es sinónimo de una amplificación correcta.

Tabla N°2. Secuencias de partidores*.

Gen	Variante	Secuencia (5'-3')
GAPDH-F		CAAATGTGGGGCGATGCTG
GAPDH-R		TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT
GSTT1⁽³⁸⁾	GSTT1_F	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
	GSTT1_R	TCACCGGATCATGGCCAGCA
GSTM1⁽³⁸⁾	GSTM1_F2	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC
	GSTM1_R2	GTTGGGCTCAAATATACGGTGG

*F partidador 1 y R partidador 2.

6.3 GSTM1 y GSTT1

Se realizó un método de PCR múltiple, según lo descrito por Yursa y colaboradores, utilizando la siguiente mezcla de reacción: 25 uL Redtaq Ready mix, 2,5 uL de cada partidador descrito en la **Tabla N°2**, 100 ng ADN y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 50 uL. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min ⁽³⁸⁾.

Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 2% p/v. La electroforesis horizontal se realizó a voltaje constante de 75 V por aproximadamente 2 horas. Como resultado se puede obtener lo siguiente:

Patrón de banda en 219 pb para el gen GSTM1 y una banda en 459 pb para el gen GSST1. ^(38, 39) La ausencia de alguna de las bandas significa la presencia del alelo nulo para el gen respectivo.

6.4 Límite de detección

Se evaluó la cantidad mínima de ADN templado que permitirá detectar el fragmento génico de interés. Para ello, a partir de una muestra de concentración conocida se generaron diluciones sucesivas entre 100 – 0,0001 ng/uL. Las diluciones se sometieron a las mismas condiciones de mezcla y reacción de PCR según cada técnica de detección y se determinó la cantidad mínima que permitiera detectar el fragmento requerido. Las bandas a detectar fueron las siguientes: en el caso del gen GSTM1 la banda se encontró en 219 pb y en el caso del gen GSTT1 la banda se encontró en 459 pb ^(38, 39).

RESULTADOS

1. Aislamiento del ADN

Se logró obtener 4 mL de sangre entera proveniente de 30 voluntarias sanas de la región de Valparaíso de Chile.

2. Calidad de ADN

En la **tabla N°3** se observan los resultados, expresados como rango (máximo-mínimo), de los parámetros de concentración (ng/uL) (A 260) y pureza (A260/A280 A260/A230) obtenidos de la extracción de ADN de las 30 voluntarias. La pureza con respecto a la contaminación por proteínas (A260/A280) estuvo en un rango recomendado para posterior análisis en todas las muestras. Se contó con suficiente material para ambas amplificaciones en todas las muestras procesadas.

Tabla N°3: Rangos de pureza y concentración del ADN obtenido.

260/280	260/230	Concentración (ng/uL)
2,22 -1,63	2,94 -1,04	63,4 – 3,8

Se evaluó la presencia de ADN con la amplificación de un gen constitutivo como GAPDH. El resultado obtenido para muestras de voluntarios se presenta en la **Figura N° 6**. Todas las muestras muestran una única banda de tamaño 283 pb, que representa el amplicón del gen constitutivo GAPDH.

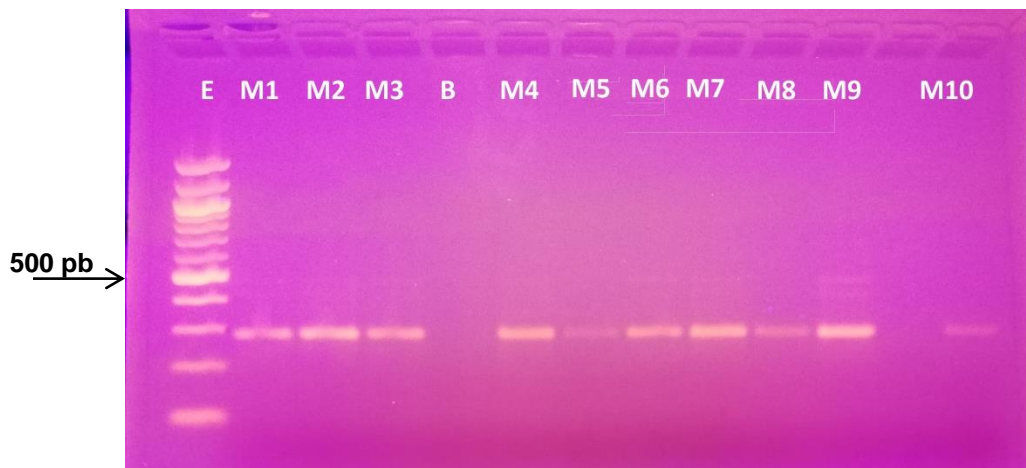


Figura N°6: Integridad del ADN por amplificación de gen constitutivo. Se presenta un gel de agarosa al 2 % correspondiente a la electroforesis del amplicón para el gen GAPDH para las muestras que se señalan. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, B control negativo (agua libre de nucleasas), M1-M10 amplicón resultante de la amplificación del gen GAPDH.

3. Amplificación de GSTM1

El genotipo GSTM1 se detectó por PCR simple. **La figura N°7** muestra un diagrama explicativo de los posibles resultados esperados: la presencia del gen GSTM1 en forma homocigota (a/a) da como resultado la detección de la banda en 219 pb, mientras que cuando hay una delección del gen, la banda está ausente, correspondiendo a un individuo de genotipo (-/-) con ambos alelos no funcionales. En las Figuras N°8 y N°9 se presentan las fotografías de dos geles de agarosa representativos de electroforesis de las amplificaciones para GSTM1. De las 30 muestras analizadas 10 presentaron el alelo nulo GSTM1*0

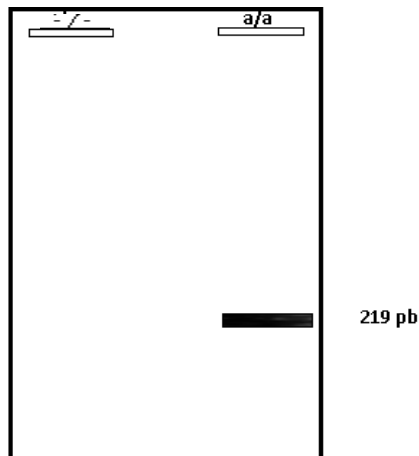


Figura N°7: Diagrama de posibles resultados de la detección del gen GSTM1 mediante PCR. De izquierda a derecha se observa un patrón homocigoto (-/-) donde no se presenta banda, debido a la delección del gen (alelo nulo). En la derecha se presenta un patrón de alelos homocigoto (a/a), con una banda de 219 pb.

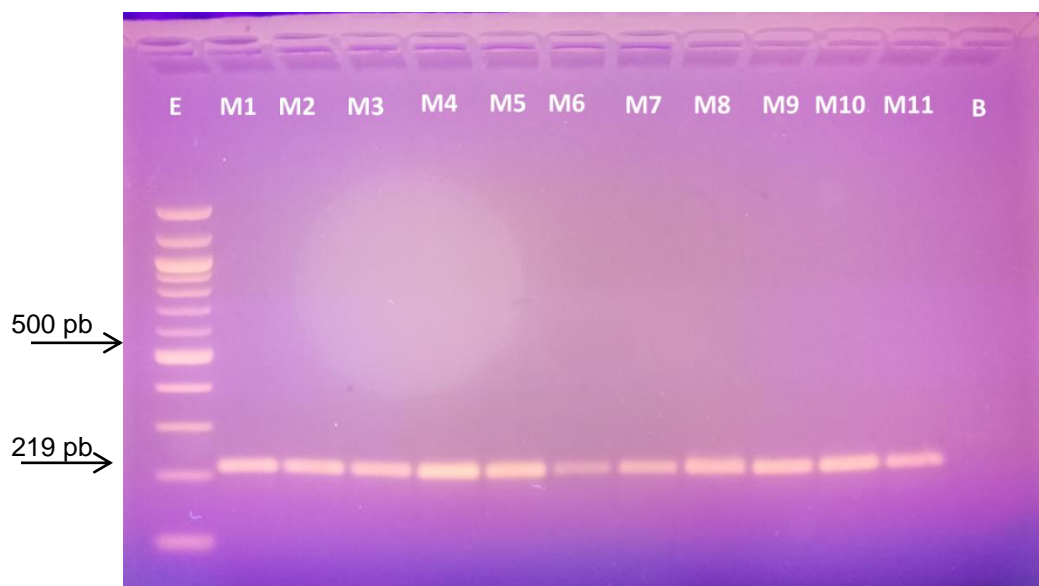


Figura N°8: Análisis de la variante GSTM1 en el gel de agarosa 2%. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, B control negativo, M1-M11 muestran un patrón de alelos homocigoto (a/a), con una banda de 219 pb, indicativo que el gen está presente.

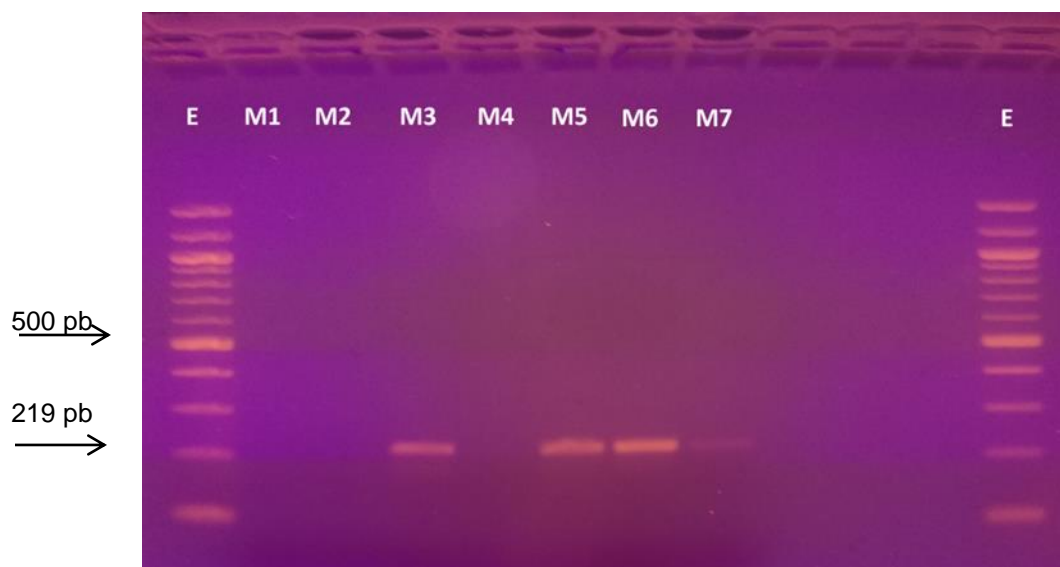


Figura N°9: Análisis de la variante GSTM1 en el gel de agarosa 2%. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, M1, M2 y M4 muestran un patrón homocigoto (-/-), indicativo de GSTM1*0. M3, M5, M6 y M7 muestran un patrón de alelos homocigoto (a/a), con una banda de 219 pb.

3.1 Límite de detección para GSTM1

Para evaluar el límite de detección se encontró que una mezcla de reacción con 0,0001 ng de material no permite detectar la banda 219 pb **figura N°10**. Luego, el límite de detección para esta metodología es 1×10^{-3} ng.

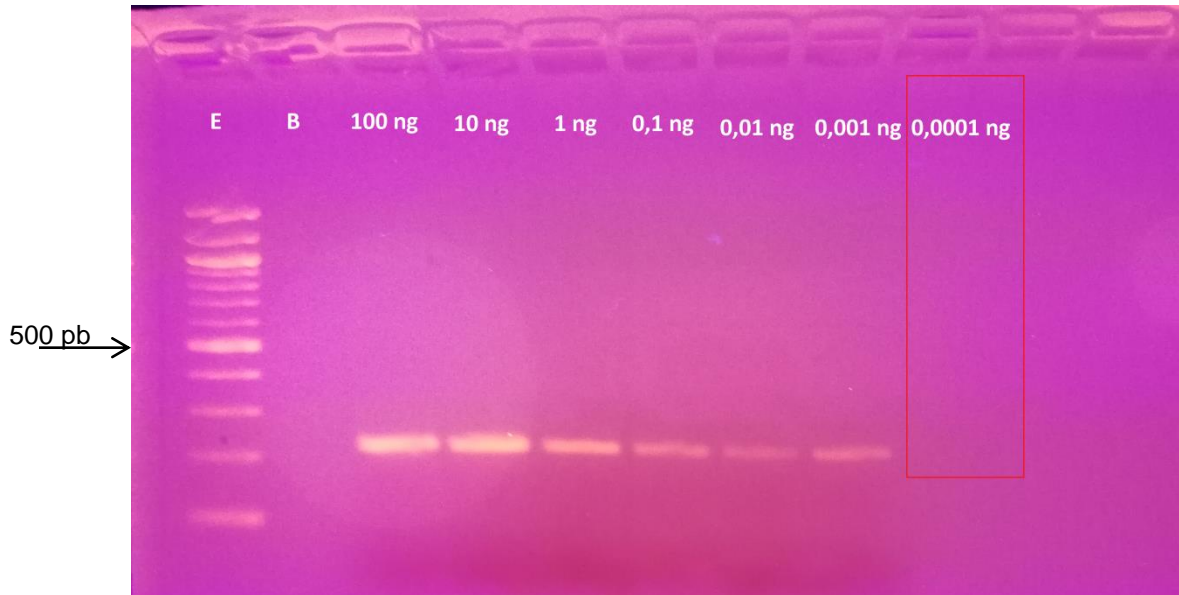


Figura N°10: Límite de detección para la variante GSTM1. E corresponde al marcador molecular de 100 pb, B control negativo y 100 – 0,0001 ng corresponden a las diferentes cantidades de material genético utilizados para la reacción.

4. Detección de la variante GSTT1

Esta prueba se efectuó por PCR múltiple para el genotipo GSTT1. La presencia del gen GSTT1 en forma homocigota (a/a) da como resultado la detección de la banda en 459 pb, mientras que cuando hay una deleción del gen, alelo GSTT1*0 (-/-), la banda está ausente y corresponde al alelo nulo o no funcional.

Para este gen en particular la corrida del gel se hizo junto al gen GAPDH debido a que es un gen que siempre amplifica, además permite comparar, ya que, a diferencia de GSTM1, los amplicones poseen diferentes tamaños moleculares. **La figura N°11** muestra un diagrama explicativo del resultado esperado. En la Figura N°12 se presenta una fotografía de un gel de agarosa representativo de electroforesis de las amplificaciones para GSTT. De las 30 muestras analizadas 8 presentaron el alelo nulo GSTT*0.

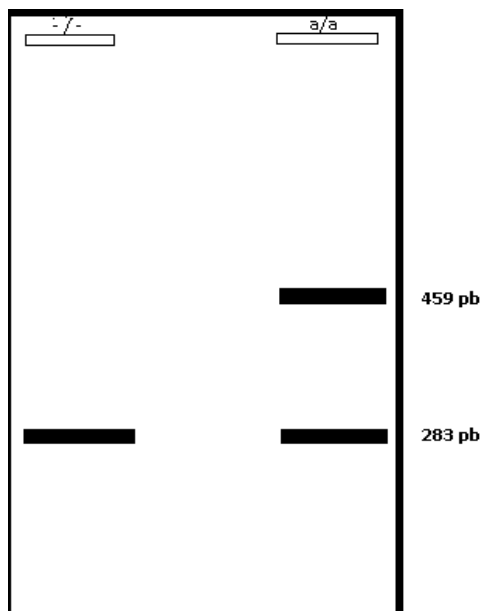


Figura N°11: Diagrama de posibles resultados de la detección del gen GSTT1 mediante PCR. De izquierda a derecha se observa un patrón homocigoto ($-/-$) donde no se presenta banda, debido a la delección del gen. En la derecha se presenta un patrón de alelos homocigoto (a/a), con una banda de 459 pb, indicativo que el gen está presente. El amplicón de la banda 283 pb corresponde al gen constitutivo GAPDH

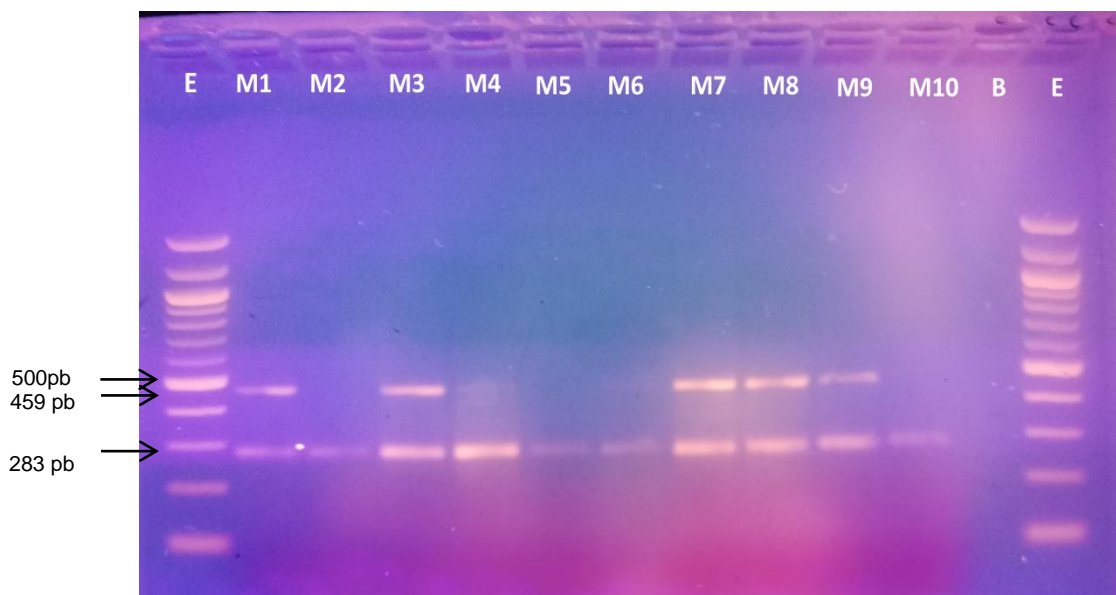


Figura N°12: Análisis de la variante GSTT1 en el gel de agarosa 2%. E corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pb, B control negativo (agua libre de nucleasas). M1, M3, M7-M9 muestran un amplicón resultante de la amplificación del gen GSTT1 con una banda en 459 pb, indicativo de la presencia de GSTT1. Las muestras M2, M4-M6 y M10 muestran un patrón homocigoto ($-/-$), indicativo de GSTT1*0 o gen nulo. El amplicón de 283 pb que aparece en todos los carriles M1 a M10 corresponde a GAPDH.

4.1 Límite de detección para la variante GSTT1

Para evaluar el límite de detección se encontró que una mezcla de reacción con 0,0001 ng de material no permite detectar la banda 459 pb **figura N°13**. En consecuencia, el límite de detección para esta metodología es 1×10^{-3} ng

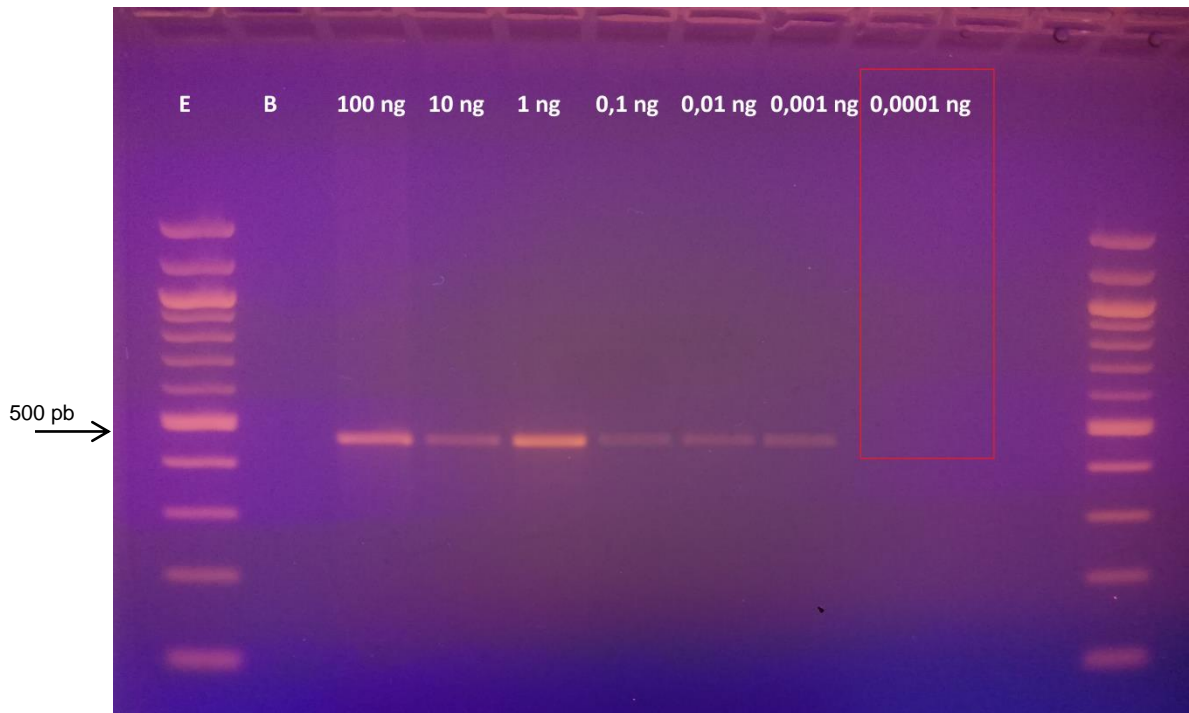


Figura N°13: Limite de detección para la variante GSTT1. E corresponde al marcador molecular de 100 pb, B control negativo y 100 – 0,0001 ng corresponden a las diferentes cantidades de material genético utilizados para la reacción.

5. Frecuencia de genotipos para GSTM1 y GSTT1

En este estudio participaron 30 voluntarias de las cuales se identificó que el 33 % de la población de estudio tenía la variante nula del gen GSTM1 y que el 27% tenía la variante nula del gen GSTT1. Dentro de la población de estudio, ninguno poseía ambos genes deletados. Estos resultados se presentan en la **Tabla N° 4**.

Tabla N°4: Frecuencia de variantes nulas

Gen	GSTM1	GSTT1	GSTM1 y GSTT1
N° de personas con variante nula	10	8	0
Frecuencia	33%	27%	0%

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad que afecta a un gran porcentaje de las mujeres en todo el mundo, y en Chile es la primera causa de muerte por éstas ⁽³⁾. Los antecedentes o características de las pacientes que padecen cáncer de mama establecen ciertos patrones de referencia que ayudan a caracterizar esta enfermedad, así, existen muchos factores que predisponen a desarrollar cáncer de mama, entre estos, los más importantes son la edad, sexo, variabilidad interindividual, factores endocrinos y factores ambientales. ⁽¹³⁾

En los últimos años ha sido objeto de análisis y debate la enorme variabilidad interindividual existente en la eficacia y toxicidad de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama, diferencias genéticas interindividuales en el transporte, metabolismo y dianas de ciertas drogas pueden tener una enorme influencia sobre el éxito o fracaso de un tratamiento determinado. Para ello aportar a la predicción de eficacia y toxicidad es necesario contar con herramientas para obtener información personalizada referente a polimorfismo de genes involucrados en la respuesta a determinado fármaco ⁽⁹⁾.

En esta tesis tuvo como objetivo contribuir a la implementación para la detección de polimorfismos genéticos asociados a eficacia y seguridad de la farmacoterapia del cáncer de mama, a través de técnicas de biología molecular por PCR para determinar variantes polimórficas que afectan la farmacodinamia y farmacocinética. En una estrategia que destaca por centrarse en la genética del paciente, más que en la del tumor, como es el caso de los estudios de Carpenter y Miller ⁽²⁰⁾ que se centran en los tumores localizados y que son positivos para los receptores de estrógeno y en el caso de metástasis Nabholtz y Gligorov ⁽¹⁹⁾ incluyen el uso de taxanos como terapia citotóxica.

Para este caso se seleccionó las variantes genéticas de dos enzimas que metabolizan fármacos utilizados para tratar el cáncer de mama; GSTM1 y GSTT1. Esto porque la presencia de variantes para ambos genes pueden producir efectos importantes en las decisiones terapéuticas. Esto porque, por una parte su frecuencia en la población es relativamente elevada, y por otra porque para ciertas drogas como los derivados del platino pueden exacerbar la toxicidad por disminución de su metabolismo y en otras cuyo mecanismo está basado en la producción de especies reactivas de oxígeno, podrían aumentar su eficacia y cuando su toxicidad se debe a EO, también pueden exacerbar toxicidades conocidas en órganos particulares. En consecuencia, el conocer la existencia de alelos nulos para estos genes podría llegar a constituir una información importante para la decisión terapéutica, antes de su inicio, especialmente en los casos más dramáticos como el cáncer de mama triple negativo.

Para la metodología se seleccionó un diseño de estudio piloto de implementación de detección de 2 polimorfismos, a través de técnicas de biología molecular, realizado en una población voluntaria de 30 mujeres, entre 18 y 60 años, a las que se les extrajo 4 mL de sangre venosa. Esta muestra es aleatoria, con criterios de inclusión y exclusión, que no se ajustan a un fundamento probabilístico, por lo que se considera poco representativa. Este tipo de estrategia para implementar la metodología tiene como ventaja un procesamiento y obtención de datos más eficientes, ya que la obtención de la muestra (voluntarias sanas) es más sencillo con respecto al enrolamiento de pacientes enfermos con tratamiento, ya que solo se necesita que se cumplan ciertos criterios de inclusión y se trata de pacientes no vulnerables respecto a las mujeres que padecen cáncer de mama ⁽⁵³⁾.

La información farmacogenómica dependerá en gran medida de la calidad de la muestra, la validación del ensayo y los métodos, que los datos obtenidos sean confiables y repetibles, y su asociación con el fenotipo clínico de la respuesta al fármaco.

Pruebas de biología molecular

La PCR convencional es una técnica rápida y versátil que tiene como ventaja requerir una cantidad mínima de templado; permitiendo una fácil y rápida obtención de resultados. Sin embargo, para contar con datos confiables, el material de partida (fase pre analítica) para ser utilizado en técnicas moleculares debe cumplir rigurosos criterios, como calidad y concentración, que se determinan a través de indicadores como pureza, rendimiento e integridad, que garantizan la idoneidad del ADN para las diferentes aplicaciones. ⁽⁴⁰⁾

Dentro de los resultados de la proporción 260/280 se aceptan generalmente una relación de 1,8 como “pura”, más dentro de los valores aceptables de pureza según bibliografía, los valores mayores de 1,6 son aceptables. Bajo este valor indica la presencia principalmente de proteínas u otros reactivos que absorben a 280 nm como el fenol y guanidina. Para este estudio en particular se obtuvo resultados que se encuentran en el rango 2,22 – 1,63 lo que se puede establecer es que no existe una contaminación significativa con proteínas, pero si se puede señalar una contaminación orgánica por la relación debajo de 1,8 en la relación de absorbancias 260/280 ⁽⁴¹⁾.

A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles, lípidos o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando la proporción 260/230 se sitúa en torno a 2,2-1,5. Una relación menor de 1,5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra ⁽⁴¹⁾, en este caso hubo valores en el rango 2,94 - 1,04 lo que es indicativo de contaminación de algunas muestras. No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación 260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra. Como en este caso se usó un kit de extracción que

ocupa como reactivos guanidina clorhidrato para aumentar la afinidad del ADN por la columna y un buffer salino para eluir el ADN ⁽³⁵⁾, ambos absorben a la longitud 230 nm, es por ello que la proporción 260/230 es considerada medida secundaria y a veces no relevante de la calidad del ADN. Cabe recalcar que estos valores fueron medidos en un espectrofotómetro Nanodrop, instrumento que podría no estar calibrado, ya que los valores en repetitivas ocasiones eran variables y eso claramente puede influir en el resultado final.

En cuanto a la integridad y calidad del ADN, ésta se determinó por la observación electroforética de una única banda en 283 pb correspondiente a la amplificación de un gen constitutivo como GAPDH ⁽³⁷⁾, lo que ratifica que la calidad del ADN es adecuada para su uso posterior. En la **Figura N°6** se puede observar por tanto que el ADN obtenido es íntegro y no posee signos de degradación, fragmentación o contaminación. Con respecto al rendimiento se obtuvo un rango entre 63,4 – 3,8 ng/uL, resultado concordante con el rendimiento máximo establecido por el proveedor del kit de 34.0 – 62,5 ng/ul, cuando la elución de ADN se efectúa con 100 a 200 uL ⁽³⁵⁾. Se descarta una subvaloración causada por contaminación con ARN (el sistema usa ARNasas) o de nucleótidos libres debido a algún proceso de degradación, ya que se comprobó su integridad, y en consecuencia la concentración calculada es fiable.

La sangre como muestra de elección para obtener ADN fue un aspecto relevante para obtener resultados conseguidos en rendimiento, pureza e integridad, ya que este tipo de muestra es ideal para estudios de esta índole. ⁽⁴²⁾ Se siguieron protocolos descritos por el fabricante para asegurar su calidad, por ejemplo, mantención de un flujo unidireccional de trabajo, áreas con equipamiento independiente, uso de un gabinete de bioseguridad clase II para realizar la extracción, almacenamiento correcto ⁽⁴⁰⁾. Para mejorar la calidad de los resultados se sugiere que el ADN deba ser extraído lo antes posible de las muestras, dentro de los primeros días después de obtenida la muestra ⁽⁴²⁾, ya que, cuando se congelan por mucho tiempo disminuye su calidad, en cuanto a pureza e integridad, lo que podría reflejarse en nulidad de resultados. También podría incluirse un blanco, que no contiene muestra (control negativo), al momento de extraer el material genético ⁽³⁶⁾ y seguir sin errores el protocolo descrito para la extracción, además de evitar cualquier contaminación cruzada, cambiando siempre de puntas al tomar algún líquido, evitando que se sobrevalore el rendimiento.

La calidad del material genético como se decía anteriormente es una etapa fundamental para seguir con pruebas posteriores, porque descarta impurezas que pudiesen conducir a hibridaciones inespecíficas o inhibición de la ADN polimerasa ⁽¹⁶⁾. La siguiente etapa es la implementación de las pruebas genéticas.

Las variantes polimórficas definidas para su validación fueron GSTM1 y GSTT. Estas variantes son enzimas detoxificantes de DOXO, una antraclina y doxetaxel

un taxano que son metabolitos de GST y se podría predecir la eficacia y toxicidad de estas drogas cuando estos polimorfismos se encuentran en el paciente.

También se postula que en pacientes con cáncer de mama la delección del gen GSTM1 o el GSTT1 ha sido relacionada con una mayor supervivencia y menor incidencia en las recaídas de la enfermedad principalmente cuando ambos genes estaban delecionados,⁽⁴³⁾ aunque el riesgo de cáncer de mama está aumentado cuando uno o ambos genes son nulos.⁽³²⁾ La mejor respuesta a la terapia en pacientes con estos alelos nulos puede asociarse a que algunos fármacos como las antraciclina tienen en su mecanismo de acción la formación de ERO, las que son neutralizadas por estas enzimas. Si estas están ausentes, aumentarán los niveles de ERO en la célula pudiendo aumentar su eficacia, aunque también su cardiotoxicidad⁽⁴⁶⁾.

Las variantes GSTM1 y GSTT1 se analizaron por PCR, ya que es una técnica sencilla y económica, aspecto siempre importante dentro de cualquier estudio con aplicación clínica. Los resultados obtenidos para cada genotipo en el gel de agarosa fueron consistentes con la descripción de Yursa y colaboradores⁽³⁸⁾, en cuanto a tamaño de los fragmentos amplificados. Lamentablemente, dificultades técnicas impidieron la secuenciación de los amplicones GSTM1 y GSTT1 porque la banda purificada desde el gel de agarosa mostró insuficiente pureza para su posterior secuenciación, lo que pudo deberse a problemas analíticos, como la inexperiencia del operador. En consecuencia, no fue posible determinar la selectividad del ensayo implementado. Para poder solucionar lo sucedido se debería aumentar la cantidad de ADN utilizado, para que los fragmentos obtenidos tuvieran la concentración mínima para su posterior aislamiento, purificación y secuenciación⁽⁴⁰⁾. Por otra parte, cuando la variante polimórfica corresponde a una delección, tampoco se puede determinar la especificidad de la determinación del alelo nulo, ya que este no amplifica y por ende mal se podría secuenciar el amplicón. Además, en el caso de los individuos heterocigotos, la secuenciación no permite diferenciar entre un genotipo salvaje y un genotipo heterocigoto para la variante⁽⁴⁰⁾. Dentro de los aspectos analíticos de la implementación de la metodología, fue posible la determinación del límite de detección para ambas amplificaciones, encontrándose límites del orden de los pico gramos, lo que da cuenta de la sensibilidad del método y de la posibilidad de reducir el volumen de muestra de sangre a extraer del paciente.

En cuanto a los controles utilizados lo ideal es por cada análisis se incorpore un control negativo y uno positivo⁽⁴⁰⁾. En esta investigación solo se contó con un control negativo, el cual contenía solo agua libre de nucleasas con los partidores y la taq polimerasa, se amplificaba igual que las demás muestras, disminuyendo así el error de que se pudiese estar amplificando algo diferente a lo buscado, lo que daba cuenta de que la amplificación de las muestras no tenían ningún contaminante o interferencias. Un control positivo se refiere a estándar de ADN

para cada genotipo, por lo que materiales de referencia puede ser muy útil, ya que, existiría un sistema de comparación.

Sobre la frecuencia de los alelos nulos (presentada en la Tabla N^o4) la variante nula del gen GSTM1 posee una frecuencia comparable con la frecuencia del gen GSTT1, que resultan bastante altas comparadas con otras variantes génicas que en general aparecen con valores bajo el 10% de la población. Pero los resultados son concordantes si se compara con la literatura. Torres y colaboradores ⁽⁵¹⁾ muestran que hay una delección más alta para el gen GSTM1 que para GSTT1, con una población de estudio de tamaño muy superior al utilizado en esta investigación, pero que coincide también con lo informado por Usategui y colaboradores ⁽⁵²⁾ que la variante nula con mayor frecuencia en la población es GSTM1 más que GSTT1. Esta relativa alta frecuencia poblacional hace que sea interesante su implementación en la clínica ya que incrementa la población potencialmente beneficiada.

Las variantes polimórficas evaluadas son de importancia para una serie de medicamentos incluyendo drogas oncológicas, que tienen alta variabilidad en la respuesta, y por lo tanto validar este tipo de ensayo sería de gran ayuda a la población. El ajuste de la dosis por superficie corporal no corrige las diferencias interindividuales en la biodisponibilidad del fármaco. ⁽¹²⁾ Esto pone de manifiesto la necesidad de proseguir con el estudio para incluir otros polimorfismos de genes en la población para construir un test farmacogenómico integral. Tal prueba genética contrastada con los resultados farmacoterapéuticos sería un logro importante en la clínica, que permitiría reducir costos al usar tempranamente el medicamento más apropiado y lo más importante mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes ⁽⁴⁴⁾. Esto porque la estrategia que se propone en esta tesis y las investigaciones que de ella deriven permitirán definir variantes genéticas asociadas a seguridad y eficacia de farmacoterapia anti cáncer de mama no sólo sobre la base de las características de su tumor (como es actualmente) sino que a su propia farmacogenómica. De esta manera se podrá definir el mejor tratamiento disponible para cada paciente, en una expresión de medicina personalizada. Con este conocimiento, se podría plantear en el futuro una medicina personalizada, en que el clínico tome decisiones tales como ajuste de dosis o sustitución de un medicamento sobre la base del perfil genético del paciente. Las estratificaciones genotípicas de los pacientes, podría identificar subgrupos con un mejor perfil pronóstico y aquellos con alelos asociados con una respuesta reducida a ciertos fármacos, lo cual podría servir de guía para la selección de terapias alternativas. La necesidad de optimización de la quimioterapia es urgente.

Un perfil genético de variantes genéticas que afecten enzimas y blancos terapéuticos de drogas involucradas en el tratamiento de cáncer de mama ayudaría a complementar la decisión en la terapia inicial. Este nuevo enfoque en el inicio del tratamiento pretende prever la problemática causada por la alta toxicidad

de los fármacos utilizados, a veces casi tan graves como el mismo cáncer, pudiéndose ajustar dosis si es que existiera una probabilidad de una expresión alterada de una enzima o receptor, tomando resguardo en la administración inicial con las drogas oncológicas, para tratar estas posibles reacciones adversas causadas por el perfil genético del paciente.

Hay en este momento poca información con respecto a la farmacogenómica, ya que no hay guías clínicas al respecto, solo existe una web llamado PHARMGKB, en el cual se puede consultar por algunos fármacos y su recomendación con respecto a enzimas metabolizadoras del mismo, mas existen variadas guías clínicas que apoyan y sustentan el uso de la farmacogenómica para apoyar la terapia de pacientes con cáncer ⁽²¹⁾, trastornos psiquiátricos, entre otros ⁽⁵⁴⁾.

Existe abundante evidencia de que las diferencias genéticas interindividuales influyen sobre la eficacia y seguridad del tratamiento. Esto es un pilar en la medicina personalizada, y el aporte de esta tesis será en conjunto con otras variantes genéticas conformar un panel de screening genético que ayudará a decidir el inicio de la terapia. Sin duda esta herramienta diagnóstica sería de enorme interés para decidir el tratamiento más apropiado para cada paciente.

CONCLUSIÓN

Considerando la hipótesis planteada y los objetivos propuestos en esta tesis, se concluye que;

La metodología para la amplificación de los genes GSTM1 y GSTT1, adaptada de protocolos descritos en la literatura y aplicada a 30 voluntarias sanas, permitió diferenciar a los individuos homocigotos para los genes GSTM1 y GSTT1 de los homocigotos para sus variantes nulas.

Las frecuencias observadas para los genes de interés son consistentes con la literatura.

Las determinaciones de GSTM1 y GSTT1 son sensibles presentando límites de detección de un pico gramo.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). Datos y cifras sobre el cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (15 de abril 2019)
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel RL., Torre LA., Jemal A., (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>. (23 de agosto 2019)
3. Gobierno de Chile. (2018). Plan Nacional de Cáncer 2018-2028, Ministerio de Salud, Departamento de Manejo integral del cáncer y otros Tumores. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf (23 de agosto 2019)
4. Gobierno de Chile. (2012). Primer informe de registros poblacionales de cáncer de Chile, Quinquenio 2003-2007. Departamento de Epidemiología, Subsecretaría de Salud pública, Ministerio de Salud
5. Icaza G., Núñez L., y Bugueño H. (2017). Descripción epidemiológica de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en Chile. *Rev. Med Chile* 145: 106 – 114.
6. Ministerio de Salud Pública. (2015). Guías Clínicas AUGE cáncer de mama. Disponible en: <http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPC-CaMama.pdf> (23 de noviembre 2018).
7. Wilkes G., Barton M., (2018). *Oncology Nursing Drug Handbook*. Burlington, USA. edition 21st. Jones & Bartlett Learning
8. Balducci B., Goetz- Perten D., y Steinman M., (2013). Polypharmacy and the management of the older cancer patient. *Annals of Oncology* 23(7):36-40.
9. Fernández A., Tejerina A., Tejerina A., Gómez F., Santiago C., Bandrés F., (2007). Aspectos farmacogenéticos en el tratamiento de cáncer de mama con tamoxifeno. Colección docencia universitaria, Fundación Tejerina unidad docente. Además comunicación gráfica SL, Madrid.

10. Ariza Y., Briceño I., y Ancízar F., (2016). Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. *Rev. Colombiana de Biotecnología*. 18(1):121-134. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77645907014> (23 de agosto 2019)
11. Singletary E., Allred C., Ashley P., Bassett L., Berry D., Bland K., Borgen P., Clark G., Edge S., Hayes D., Hughes L., Hutter R., Morrow M., Page D., Recht A., Theriault R., Thor A., Weaver D., Wieand H., y Greene F. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 20:3628-3636. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Ann_Thor/publication/11185281_Revisi_on_of_the_American_Joint_Committee_on_Cancer_Staging_System_for_B_reast_Cancer/links/5581d34f08ae1b14a0a10112.pdf
12. Flores C. Detección de SNP en genes cyp2c8 de pacientes con cáncer de mama que reciben paclitaxel en el instituto nacional de enfermedades neoplásicas de marzo a diciembre 2013. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2014.
13. Ghoncheh M., Pourmamdar Z., y Salehiniya H. (2017). Incidence and mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer* 17(3): 43 -46
14. Ortiz L. y Tabak R. (2012). Farmacogenómica en la práctica Clínica. *Rev. Med Clínica Las Condes*. 23(5): 616 – 621.
15. Petrides A., Clarke W. y Marzinke M. (2014). Application and utility of pharmacogenetics in the clinical laboratory. *J. Analyt. Molecul Tech*. 1(1): 1 15.
16. Zhao Z., Boerwinkle E. (2002). Neighboring-nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome. *Genome Res*. 12(11):1679-86
17. Nassan, M., Nicholson, W., Elliott, M., Rohrer Vitek, C., Black, J., Frye, M. (2016). Pharmacokinetic Pharmacogenetic Prescribing Guidelines for Antidepressants: A Template for Psychiatric Precision Medicine. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(7), 897–907
18. Tolosa A. (2016). Medicina de precisión en psiquiatría: Farmacogenética y farmacocinético para prescribir antidepresivo. *Genética médica news* Disponible en: https://genotipia.com/genetica_medica_news/medicina-precision-psiQUIATRIA/

19. Carpenter R., Miller WR. (2005). Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*. 93(1): 1-5.
20. Nabholz JM., Gligorov J. (2005). The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother*. 6(7): 1073-1094.
21. Marsh S., McLeod HL. (2004). Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer* 90(1): 8-11.
22. Borah PK., Shankarishan P., Mahanta J. (2011). Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and risk of hypertension in tea garden workers of North-East India. *Genet Test Mol Biomarkers* 15(11):771-6.
23. Prado Y, Arancibia A, Vizcaíno M, Abeledo C, Rodeiro C, (2011) Farmacogenética aplicada al tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(3):283-290.
24. Soto O., Cabrera P., Téllez G., Barrera J., Juárez A., Castillo J. (2011) Relationship of Polymorphisms of Glutathione S-Transferase GSTT1 and GSTM1 with the Response to Chemotherapy in Mexican Women with Advanced Breast Cancer. *Journal of Cancer Therapy* 2 (3):6691-8-
25. Moreno V., Vicuña S. Detección del polimorfismo del gen GSTM1 en mucosa oral sana en mayores de 40 años. Trabajo de Investigación para optar al título de cirujano dentista. Universidad Andrés Bello, Chile, 2016
26. Quiñones L., Roco A., Squicciarini V., Cáceres D., Miranda C., Sasso J., Agúndez J., García-Martín E., Saavedra I. (2010) Polimorfismos genéticos y su influencia en la efectividad del tratamiento quimioterapéutico de pacientes leucémicos. *Cuad Med Soc*. 50(4):288-295
27. Jiménez V. Bases posológicas en oncología. Discurso de Víctor Jiménez Torres leído en la sesión del día 1 de marzo de 2007 para su ingreso como académico de número. Instituto de España, Madrid, 2007
28. Lehnert M. (1996) Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifactorial Problem. *Eur J Cancer* 32A (6): 912-920.
29. Sánchez-Suárez P, Bentiez-Bibriesca L. (2006) Procesos biomoleculares de la Resistencia a drogas. *Cancerología Vol 1* pp. 187-199
30. Souhami R., Tannock I., Hohenbreg P., Horiot JC. (2002) *Oncology*, Oxford University Press. Capítulo 11.8 y 11.7.

31. Atocha A. Predicción de la respuesta al tratamiento con doxorubicina docetaxel en cáncer de mama mediante modelos pronósticos unigénicos y poligénicos. Memoria para optar al título de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid, España, 2010
32. Park K., Yim D., Yoon K., Choi I., Choi J., Yoo K., Kang D. (2004). Combined effect of GSTM1, GSTT1, and COMT genotypes in individual. *Breast Cancer Research and Treatment*, 88(1), 55–62.
33. United States Pharmacopoeial Convention and National Formulary 25st. 94 USP XXXVIII. United States Pharmacopoeia Convention. Rockville: Staff Liaison; 2015.
34. Sigma- Aldrich. REDTaq ReadyMix PCR reaction mix with MgCl₂. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/standard-pcr.html> (1 de septiembre 2019)
35. Qiagen. 2003. QIAamp DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook. Disponible en: http://emerald.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf. (2 de noviembre, 2016).
36. Pelt-Verkuil E., Belkum A., Hays JP. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. En Pelt-Verkuil E., Belkum A., y Hays JP. *The different types and varieties of nucleic acid target molecules*. Netherland: Springer
37. Somoza R., Acevedo C., Albornoz F., Luz-Crawford P., Carrión F., Young M., and Weinstein-Oppenheim C. (2017). TGFβ₃ secretion by three-dimensional cultures of human dental apical papilla mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 11(4):1045-1056.
38. Yusra A., Salwa A., Nahi Y., and Ahmed S. (2016). Association of Human GSTM1 and GSTT1 Genes Polymorphisms with Prostate Tumors in Population of the South Provinces of Iraq. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 5(12): 678-686
39. Orhan O., Orhan F., Karkucak M., Centinkaya D., And Cengiz C. (2014). Glutathione S-Transferase M1 and T1 gene polymorphisms are not associated with increased risk of gestational diabetes mellitus development. *West Indian Med J*. 63(4):300-306
40. Gomez 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_{2A}. Tesis para optar al grado de Magíster en Análisis Clínico. Universidad de Valparaíso, Chile, 2017

41. Banco Nacional de AND Carlos III. Programa control de calidad de muestras. Universidad de Salamanca. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> (1 de septiembre 2019)
42. Knebelberger T., y Stoger I. (2012). DNA extraction, preservation, and amplification. *Methods Mol Biol* 58:311-38.
43. Alejandro G. Influencia de la variabilidad genética entre donante y receptor de los alelos GSTM1 y GSTT1, en la incidencia de la enfermedad injerto contra receptor aguda en pacientes sometidos a transplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Universidad de Malaga, Malaga, 2016.
44. Rocco A., Quiñones L., Miranda C., Squicciarini V., Agúndez J., García E., Moreno I., y Saavedra I. (2009). Farmacogenética en el laboratorio clínico ¿Un lujo o una necesidad en Latinoamérica? *Rev Farmacol Chile* 2(1):1-8.
45. Santaballa, A. (2017). Cáncer de mama. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1> (13 de octubre, 2019)
46. Imigo F., Mansilla E., Delama I., Poblete M., Fonfach C. (2011), Clasificación molecular del cáncer de mama, *Cuad Cir.* (25): 67-74
47. Avedaño C., Espada M. (1996) Fármacos que actúan sobre receptores intracelulares (II). Fármacos que interaccionan con ácidos nucleicos. En: Avedaño C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Interamericana-McGraw-Hill: 525-548.
48. Matos YH, Roche LD, González MR, Aportela RA. (2011) El estrés oxidativo: detonante fisiopatológico en la cardiomiopatía dilatada inducida por doxorubicina. *Revista Finlay.* 1(3):214-20.
49. Torrisi R., Zuradelli M., Agostinetti E., Masci G., Losurdo A., De Sanctis R., Santoro A. (2019) Platinum salts in the treatment of BRCA-associated breast cancer: A true targeted chemotherapy? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (135): 66-75
50. Strange R., Spiteri M., Ramachandran S., Fryer A. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research* 482: 21-26

51. Torres M., Acosta P., Sicard M., Groot de Restrepo H. (2004). Susceptibilidad genética y riesgo de cáncer gástrico en una población del Cauca. *Biomédica*, 24(2), 153.
52. Usategui-Martín R, Corral E, Alonso M, Calero-Paniagua I, Carranco-Medina TE, Quesada-Moreno A, et al. Estudio de las deleciones de los genes GSTM1 y GSTT1 y del polimorfismo Ile105Val del gen GSTP1 en pacientes con enfermedad ósea de Paget. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014 6;4:83-8
53. Varela C. El paciente, voluntario sano y el ensayo clínico. Papel, obligaciones y derechos, pros y contras de su participación. Trabajo de fin de grado para optar al título de Médico. Universidad de Cantabria, Santander, 2016
54. Acuña M. (2007) Genética y farmacogenómica en psiquiatría. Sociedad de Neurología, Psiquiatría y Neurocirugía. Serie Roja. Chile.137

ANEXOS

Anexo N°1

CBI – Facultad de Farmacia

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA N°011/2018

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 “DISEÑO DE UNA HERRAMIENTA DE SCREENING FARMACOGENÓMICO PARA COMPLEMENTAR LA DECISIÓN DE LA TERAPIA FARMACOLÓGICA INICIAL EN CÁNCER DE MAMA” (Versión 19.06.2018), presentado por el investigador Carlos Leiva Jeldes, alumno 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 diseñar una herramienta de screening farmacogenómica innovadora, que no existe en el mercado, que abarque 8 polimorfismos involucrados en la respuesta a fármacos para el cáncer de mama con el fin de complementar la decisión en la selección del tratamiento inicial.


Metodología. Se trata de un estudio piloto de validación de 8 polimorfismos a través de técnicas de biología molecular que se realizará en una población voluntaria de mujeres, entre 18 y 60 años, a las que se les extraerán 4 mL de sangre venosa. Sobre esta muestra biológica se extraerá el ADN genómico leucocitario, determinando sus características de

calidad, validación de las técnicas farmacogenómicas a través de secuenciación y elaboración de protocolos.

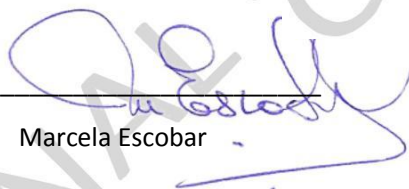
Acta CBI 011/2018

- 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 sangre 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

Acta CBI 011/2018

Anexo N°2

Criterios de inclusión y exclusión	
Inclusión	Exclusión
Edad entre 18 y 60 años	Embarazadas y Nodrizas
	Voluntarias que al momento de la toma de muestra presenten alguna patología sanguínea como trastornos de la cascada de la coagulación, inmunodeficiencia de algún elemento de la línea blanca
	Menores de 18 y mayores de 60 años
	Discapacidad mental
	Hipoacusia

No se excluirán voluntarias que al momento de la toma de muestra presente alguna patología no transmisible, puesto que no se evaluará la concentración de ningún analito que pudiera verse afectado por alguna patología

Anexo N°3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado(a) voluntario le invitamos a participar en un estudio desarrollado por Carlos Leiva J., Rut: 17.478.669-0, estudiante de la carrera de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso, el cual se realizará en las dependencias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, bajo el patrocinio y tutoría del Sr. Víctor Gómez Saavedra, Magister en Análisis Clínico y colaborador de la carrera de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

El estudio se titula “Medicina de precisión: Diseño de una herramienta de screening farmacogenómico para complementar la decisión de la terapia farmacológica inicial en cáncer de mama”. Esta herramienta les permitirá a los pacientes con cáncer de mama obtener una terapia más personalizada, lo que puede contribuir a mejorar la eficacia y disminuir los efectos adversos de sus tratamientos.

Su participación es **voluntaria** y puede elegir ser o no ser parte del estudio. De igual forma, si usted acepta participar, puede retirarse en cualquier momento que estime conveniente, sin problemas ni sanciones. En caso de dudas o consultas podrá dirigirse directamente o vía correo electrónico con el investigador del proyecto, cuyo correo de contacto es: **carlos.leiva@alumnos.uv.cl**

Durante el estudio se hará una toma de muestra de sangre (a cargo de personal capacitado) a la cual se le realizará un análisis genético. Las molestias que le pudieran ocasionar son las asociadas al proceso toma de muestra: malestar por el pinchazo de la aguja (el cual se puede mitigar con aplicación de hielo), y la posible presencia de debilidad posterior a la extracción de la muestra, la cual se resolverá con la entrega de una colación.

Sus datos serán identificados por medio de un código el cual incluye sus iniciales, de manera que toda la información recopilada al respecto será **estrictamente confidencial**. Asimismo, es importante destacar que su participación es gratuita y ninguno de los miembros del equipo en este estudio recibirá dinero ni compensaciones por ello. A Ud. se le entregará una copia de este consentimiento para efectos que estime conveniente. Si los resultados obtenidos fueran publicables, solo se presentarán estos y no su identidad.

Este consentimiento informado será custodiado por el patrocinante Sr. Víctor Gómez S., con domicilio en Calle San Daniel #220, Concón, región de Valparaíso, Chile.

Formulario de consentimiento informado:

Yo, _____, Rut: _____ con fecha ___ / ___ / ___, declaro que me ha sido leída y he leído la información proporcionada, he podido aclarar mis dudas y mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente. Autorizo voluntariamente para que se me extraiga una muestra de sangre por punción venosa para efectuar estudios científicos.

ACEPTO

En Valparaíso, mayo del 2018

Anexo N°4



SE INVITA A PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Se invita a participar como voluntario para el desarrollo del proyecto de investigación UVA 1402/ 2018: “Diseño de una herramienta de screening farmacogenómico para complementar la decisión de la terapia farmacológica inicial en cáncer de mama”

Se necesitan voluntarias entre los 18-59 años y que estén dispuestos a donar 4 mL de sangre, que serán extraídos: **el día Viernes 26 de noviembre de 9 a 15 horas en la sala de evaluación nutricional** por técnico paramédico.

No se ofrecerán remuneración.

Si estás interesado contactar a Carlos Leiva o Yennypher Órdenes:

carlos.leiva@alumnos.uv.cl

yennypher.ordenes@alumnos.uv.cl