

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***VARIANTES GENÉTICAS EN GENES RELACIONADOS CON
EFAVIRENZ, ATAZANAVIR Y SU ASOCIACIÓN CON LAS
REACCIONES ADVERSAS EN PACIENTES QUE VIVEN CON VIH***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

DANIELA LORENA POBLETE ASTROZA

Director de Tesis: Dr. Luis Quiñones Sepúlveda

Santiago-CHILE

Julio 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

DANIELA LORENA POBLETE ASTROZA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido _____ el _____ día

Director de Tesis:

Dr. Luis Quiñones S.

Co-director de Tesis:

Dr. Nelson Varela F.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Maria Nella Gai H.

Dra. Elena Vega C.

Dr. Javier Morales M.

Dra. Rosemarie Mellado S.

Dedicatoria

A mis padres.

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a todos quienes me acompañaron en este proceso de tanto aprendizaje tanto a nivel personal como académico.

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo por el financiamiento otorgado mediante la Beca Doctorado Nacional 2016, folio 21160655 y el beneficio complementario de Gastos operacionales para desarrollo de la tesis.

A los docentes de mi comisión, muchas gracias por la ayuda y los consejos en este proceso.

Al Dr. Kogan, Dr. Quiñones y Dr. Varela por el apoyo fundamental que me entregaron a lo largo de mi estadía en el programa. Estaré eternamente agradecida de ustedes.

A mi Laboratorio CQF, gracias por brindarme un hogar cuando creí que no lo encontraría viviendo en Santiago. A Gaby, por el apoyo de siempre desde que iniciamos el programa de doctorado.

A mi familia que a la distancia me apoya y acompaña. Gracias papás y Alejandra por estar siempre a mi lado, creyendo en mí.

A mis amigos, que son también mi familia.

Tabla de contenido

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Tabla de contenido	III
Índice de tablas y figuras	VI
Resumen	IX
1. Introducción	1
1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana	
1.2 Epidemiología	
1.3 Farmacoterapia en VIH	
1.4 Metabolismo de fármacos	
1.5 Factores que influyen en la respuesta a la Terapia Antirretroviral (TAR)	
2. Hipótesis Y Objetivos	13
2.1 Hipótesis de trabajo	
2.2.1 Objetivo general	
2.2.2 Objetivos específicos	
3. Metodología	14
3.1 Diseño del estudio para determinar frecuencia de CYP2B6*6 en población general chilena.	
3.1.1 Determinación del porcentaje de mezcla aborígen/caucásica	
3.2 Diseño del estudio para determinar frecuencia de UGT1A1*28 en población general chilena	
3.2.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg y tipificación de grupo sanguíneo para análisis de porcentaje de mezcla amerindio-caucásica	
3.2.2 Desequilibrio de ligamiento	
3.3 Diseño del estudio para caracterizar a la población chilena que vive con VIH	
3.3.1 Criterios de selección	

- 3.3.1.1 Criterios de inclusión
- 3.3.1.1 Criterios de Exclusión
- 3.3.2 Tamaño muestral
- 3.3.3 Información a recolectar
- 3.3.4 Obtención y tratamiento de muestras sanguíneas:
- 3.3.5 Análisis estadístico

4. Resultados

28

4.1 Resultados del estudio para determinar frecuencia de CYP2B6*6 en población general chilena.

- 4.1.1 Muestra estudiada
- 4.1.2 Determinación del porcentaje de mezcla aborigen/caucásica de la población estudiada
- 4.1.3 Frecuencias génicas y alélicas de los rs3745274, rs2279345 y rs8192719 del gen *CYP2B6*
- 4.1.4 Correlación de los genotipos obtenidos para los SNPs del gen *CYP2B6* estudiados
- 4.1.5 Evaluación de los desequilibrios de ligamiento (D') reestimados en población de pacientes chilenos, para los resultados obtenidos en el presente estudio.
 - 4.1.5.1 Para los rs3745274 y rs8192719 se tiene un $D' = 0,94$
 - 4.1.5.2 Para los SNPs rs8192719 y rs2279345 se tiene un $D' = 0,92$
 - 4.1.5.3 Para los rs3745274 y rs2279345 se tiene un $D' = 0,86$

4.2 Resultados del estudio para determinar frecuencia de UGT1A1*28 en población general chilena.

- 4.2.1 Genotipificación por discriminación alélica con sondas TaqMan®
- 4.2.2 Genotipificación por *Polymerase chain reaction-single-strand conformation Polymorphism* (PCR-SSCP).
- 4.2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg
- 4.2.4 Porcentaje de Mezcla amerindio-caucásica
- 4.2.5 Desequilibrio de Ligamiento

4.3 Resultados del estudio en pacientes que viven con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	
4.3.1 Reclutamiento de pacientes	
4.3.2 Recopilación de Reacciones adversas	
4.3.3 Distribución de genotipos en pacientes portadores de VIH en TAR	
4.3.4 Análisis regresión logística respecto a efavirenz.	
4.3.5 Análisis regresión logística respecto a atazanavir.	
5. Conclusiones	64
6. Referencias Bibliográficas	66
7. Anexos	71

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Características de secuencias blanco para detección de ambos SNPs.	18
Tabla 2. Protocolo de tinción con Nitrato de Plata (AgNO ₃) para análisis de polimorfismos de cadena simple (SSCP).	19
Tabla 3: Matriz para calcular el “Valor D” para alelos en los loci A y B	22
Tabla 4. Variantes genéticas a evaluar según fármaco.	26
Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs8192719.	29
Tabla N° 6. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs2279345.	29
Tabla N° 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs3745274	29
Tabla 8. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers (“V”) o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs3745274 y rs2279345.	30
Tabla 9. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers (“V”) o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs3745274 y rs8192719.	30
Tabla 10. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers (“V”) o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs2279345 y rs8192719.	31
Tabla 11. Medida relativa de desequilibrio de ligamiento (D´) para tres SNPs del gen CYP2B6, obtenido de un análisis de haplotipos en pacientes chilenos sometidos a Terapia Antirretroviral.	32
Tabla 12. Frecuencias genotípica y alélica para el <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> rs6742078 en población chilena.	37
Tabla 13. Frecuencias genotípica y alélica para el <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> rs887829 en población chilena.	37
Tabla 14. Frecuencias genotípica y alélica para el polimorfismo <i>UGT1A1*28</i> en población chilena.	41
Tabla 15. Test de chi cuadrado para las frecuencias genotípicas en la población estudiada para los <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> rs6742078 y rs887829.	43
Tabla 16. Test de chi cuadrado para las frecuencias genotípicas en la población estudiada para <i>UGT1A1*28</i> .	43
Tabla 17. Distribución de los grupos sanguíneos, frecuencia alélica para el sistema ABO y porcentaje de mezcla amerindio caucásico (%M _{A-C}).	44
Tabla 18. Matriz de co-ocurrencia para el cálculo del “Valor D”	45
Tabla 19. Características generales de la población en estudio.	47
Tabla 20. Reacciones adversas a medicamentos registrados (RAMs) en la muestra de pacientes.	48
Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes de la muestra.	51
Tabla 22. Referencia de frecuencias obtenidas para los <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> estudiados, con distintas poblaciones.	52
Tabla 23. Regresión logística univariada entre <i>CYP2B6</i> c.518G>T (rs3745274) y pesadillas en pacientes tratados con efavirenz.	54

Tabla 24. Regresión logística univariada entre <i>CYP2B6</i> c.518G>T (rs3745274) y reacciones adversas a nivel de SNC agrupadas (pesadillas, insomnio, ansiedad e intentos suicidas) en pacientes tratados con efavirenz.	54
Tabla 25. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> e hiperbilirrubinemia en pacientes tratados con efavirenz.	55
Tabla 26. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> y malestar gastrointestinal en pacientes tratados con efavirenz.	56
Tabla 27. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> y mareos en pacientes tratados con efavirenz.	56
Tabla 28. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> y rash en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.	57
Tabla 29. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> e insomnio en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.	57
Tabla 30. Regresión logística univariada de <i>CYP2B6*6</i> y dolor de cabeza en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.	57
Tabla 31. Regresión logística univariada de modelo de <i>CYP35A*3</i> y dolor gastrointestinal en modelo recesivo en pacientes tratados con efavirenz.	58
Tabla 32. Regresión logística univariada entre <i>UGT1A1*28</i> (TA ₇) y niveles de bilirrubina con punto de corte 1,2 mg/dL en pacientes tratados con atazanavir.	59
Tabla 33. Regresión logística univariada entre <i>UGT1A1*28</i> (TA ₇) y niveles de bilirrubina > 1,9 mg/dL (moderada y severa hiperbilirrubinemia) en pacientes tratados con atazanavir.	60
Tabla 34. Regresión logística univariada entre <i>UGT1A1*28</i> (TA ₇) y rash en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.	60
Tabla 35. Regresión logística univariada entre <i>UGT1A1*28</i> (TA ₇) y molestias gastrointestinales.	61
Tabla 36. Regresión logística univariada entre <i>UGT1A1*28</i> (TA ₇) y dolor de cabeza en modelo dominante en pacientes tratados con atazanavir.	62
Tabla 37. Regresión logística univariada entre <i>CYP3A5*3</i> e hiperbilirrubinemia en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.	62
Tabla 38. Regresión logística univariada entre <i>CYP3A5*3</i> y malestar gastrointestinal en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.	62

Figura 1. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana. Extraída de Clinical Info HIV.gov. U.S. Department of Health & Human Services.	4
Figura 2. Pacientes que viven con VIH a nivel mundial al año 2020. Extraída de ONUSIDA.	5
Figura 3. a) Estructura molecular de efavirenz y b) Metabolismo del fármaco a nivel hepático (PharmGKB).	10
Figura 4. Estructura molecular de atazanavir y b) Metabolismo del fármaco a nivel hepático (PharmGKB).	11
Figura 5. Representación esquemática de los patrones de bandas, tras la tinción con nitrato de plata.	20
Figura 6. Genotipificación por discriminación alélica con sondas <i>TaqMan</i> ® para rs6742078.	38
Figura 7. Genotipificación por discriminación alélica con sondas <i>TaqMan</i> ® para rs887829.	39
Figura 8. Resultado representativo de la genotipificación por PCR-SSCP con tinción con nitrato de plata.	40
Figura 9. Curvas de amplificación representativas obtenidas por PCR tiempo real para análisis genotípico con sondas <i>TaqMan</i> ®.	50

Resumen

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se considera una amenaza a la salud mundial y, en el contexto actual, los pacientes corren más riesgos frente al COVID19 dada la acción del VIH sobre el sistema inmune. Si bien al inicio de las infecciones por VIH los primeros casos no tenían una gran variedad de medicamentos antirretrovirales, hoy existen diversas alternativas cuyo acceso está garantizado por el estado. Esto ha ayudado directamente a que la condición tenga un carácter crónico y a disminuir la mortalidad asociada a ella en un inicio. Dentro de los medicamentos utilizados está efavirenz (EFV) y atazanavir (ATV), cada uno asociado a reacciones adversas a medicamentos (RAMs) que pueden o no ocurrir. En esa variabilidad interindividual surge la pregunta de qué define que algunas personas las desarrollen y otras no. Uno de los factores a considerar es la genética propia de cada paciente. En el caso de EFV, en otras poblaciones, se ha asociado a una variante en CYP2B6*6, enzima encargada de metabolizar al fármaco, con la aparición de RAMs. En el caso de ATV, igualmente en otras poblaciones, se ha asociado la aparición de RAMs con una variante en UGT1A1*28. Si bien esta enzima no metaboliza el fármaco, sí ve alterada su función en presencia del fármaco.

En este contexto resulta relevante poder definir cómo se comporta la población chilena. Por esa razón, el objetivo de este trabajo es estudiar la relación entre variantes genéticas CYP2B6*6, CYP3A4*1B, CYP3A5*3 y UGT1A1*28 y la aparición de RAMs producidas por el tratamiento antirretroviral con efavirenz y atazanavir en pacientes que viven con VIH. Eso involucra conocer las frecuencias de las variantes principales, CYP2B6*6 y UGT1A1*28 en nuestra población, a través del análisis de muestras de población general disponibles en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se realizó un estudio epidemiológico, de tipo caso-control y observacional. La metodología involucró la genotipificación de muestras de sangre de pacientes obtenidas en el Hospital San Juan de Dios (HSJD) y analizadas posteriormente en el Laboratorio CQF. Se estableció la frecuencia de los alelos de CYP2B6*6 y UGT1A1*28 en población chilena, para luego dar cumplimiento al objetivo enfocado en pacientes que viven con VIH. Paralelo a eso se realizó una revisión de fichas clínica de los pacientes.

Este estudio reclutó a 70 pacientes, con edad promedio de $35,9 \pm 10,4$ años, mediana de 34 años y un grupo etario de 30 a 39 años (37,1%) como el más prevalente. Cincuenta y seis pacientes de sexo masculino y 14 pacientes de sexo femenino (80% y 20% respectivamente), todos de nacionalidad chilena. Del total de pacientes enrolados, 31 de ellos utilizó EFV, 31 ATZ y sólo 8 recibieron EFV y ATZ en diferentes regímenes separados temporalmente. De este último grupo, cada uno de ellos se considera como paciente individual en los análisis estadísticos (44,28%; 44,28% y 11,43%). Se registraron 12 reacciones adversas en base a lo obtenido en las fichas clínicas de los pacientes estudiados. Las reacciones adversas de mayor incidencia fueron la hiperbilirrubinemia observada en 28 pacientes, luego, las reacciones adversas gastrointestinales presentadas en 19 pacientes y las reacciones adversas a nivel del SNC agrupadas, observadas en 15 pacientes.

Aunque hubo RAMs en ambos grupos de pacientes (tratados con EFV o ATV), la presencia de RAMs en el SNC fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que recibió EFV, mientras que la hiperbilirrubinemia (bilirrubina total $> 1,2$ mg/dL) fue más frecuente en pacientes que recibieron ATV, considerando que la distribución del resto de la TAR que acompañaba a EFV y ATV tuvo un comportamiento similar. Por lo tanto, en este estudio se pudo determinar que un grupo de pacientes presentó eventos adversos específicos según su terapia.

Tras la identificación y cuantificación de las distintas RAMs presentadas por el grupo de pacientes en estudio, se logró establecer la relación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo UGT1A1*28 (TA7) e hiperbilirrubinemia moderada y severa en pacientes tratados con ATV (OR: 12,25; *p-value*: 0,043) en genotipo homocigoto para TA7 en modelo codominante. Igualmente se logró establecer la relación estadísticamente significativa entre la presencia de la variante CYP2B6 c.516G>T con las RAMs pesadillas (OR: 13 y *p-value*: 0,026 para genotipo T/T en modelo de herencia codominante; OR: 7,43 y *p-value*: 0,037 en modelo recesivo) y toxicidad general a nivel del SNC (OR: 32,50 y *p-value*: 0,009 para genotipo T/T en modelo codominante; OR: 15,63 y *p-value*: 0,018 en modelo recesivo), en pacientes tratados con EFV.

En el presente estudio se logró establecer una asociación entre variantes genéticas específicas y RAMs para atazanavir y efavirenz, demostrando la utilidad que puede prestar

la farmacogenética en el ejercicio clínico, en una patología de alta incidencia, muy relevante como carga en salud pública y de importancia social, como lo es el VIH.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a lo largo de la historia diversas situaciones que se consideran una amenaza para la salud de la población. El año 2018 identificó a las enfermedades no transmisibles (ENT) como las responsables del 71% de las muertes a nivel mundial, y el año 2019 definió al cambio climático, las superbacterias, los entornos frágiles y vulnerables (lugares con crisis prolongadas como sequía y hambruna, con servicios de salud débiles), el movimiento antivacunas, el ébola y otros patógenos, la débil atención primaria de salud, las ENT y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como una amenaza para la salud mundial (OMS, 2019).

La realidad de estos días, sitúa a la infección por SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* por sus siglas en inglés) como la responsable de una pandemia dado las características y alcance de los contagios. A la fecha, en nuestro país han fallecido 57.614 personas por COVID19 y desde marzo de 2020 se han confirmado 3.061.019 contagios. El diagnóstico es posible gracias a una Red de Laboratorios Clínicos con 196 centros distribuidos a lo largo del país que se encargan de la confirmación diagnóstica de las muestras obtenidas. Al 25 de febrero de 2022, un 93,17% de la población objetivo desde los 18 años y 80,41% entre los 3 y 17 años se encuentra vacunada con esquema completo (Gobierno de Chile, 2022).

La aparición de esta pandemia generó cambios en la forma de trabajo de las personas, en su movilidad y también en sus atenciones en salud. Aquellos pacientes más expuestos, según su diagnóstico, corren el riesgo de desarrollar un cuadro más complejo, por ejemplo, aquellos con *diabetes mellitus*, enfermedad respiratoria crónica, cáncer, VIH, entre otros (Chenneville *et al.* 2020; Gao *et al.* 2021).

Por ejemplo, aquellos pacientes que viven con VIH y que contraen la infección de SARS-CoV-2 sufren cuadros más graves y tienen mayores comorbilidades que las personas que no viven con VIH. De igual forma, las restricciones a raíz de la pandemia actual interrumpieron las pruebas de VIH generando fuertes caídas en los diagnósticos y derivaciones en el tratamiento contra el VIH siendo los países africanos y asiáticos los más afectados según un estudio realizado en 502 centros de salud en 32 países del área (ONUSIDA, 2022). Desde ONUSIDA la recomendación a los pacientes que viven con VIH

y en contexto pandemia, es que tengan el suministro de productos médicos necesarios para 30 días o más. Esto incluye tanto la terapia antirretroviral (TAR) como otros medicamentos comunes, ya que también han propuesto la dispensación de tres o más meses de medicamentos para el VIH para los pacientes con visitas rutinarias.

1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus de la familia *retroviridae*. Tiene su material genético en forma de ARN, el cual está cubierto por una cápside. A su vez esta cápside está cubierta por un manto que tiene glicoproteínas (**Figura 1**). El VIH es el agente responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y ataca a un grupo de células del sistema inmune llamados linfocitos T CD4⁺. En la fase aguda de la infección se produce una activa replicación, lo que genera una alta carga viral (CV) (Satou *et al*, 2017) que se puede cuantificar a través de un examen de laboratorio.

Este virus puede transmitirse a través de relaciones sexuales, por transfusiones de sangre, por el uso compartido de jeringas contaminadas en centros de atención de salud, de forma vertical madre-hijo durante el embarazo, el nacimiento y la lactancia (ONUSIDA, 2022). Dentro de las medidas de prevención para evitar la transmisión sexual del VIH están el tener una relación monógama entre personas no infectadas, el sexo sin penetración, el uso correcto de preservativos femeninos y masculinos, el sexo entre 2 personas cuando una de ellas vive con VIH pero está en TAR y tiene CV indetectable y la administración de profilaxis preexposición a personas no infectadas (ONUSIDA, 2022).

El SIDA, por su parte, es causado por dos tipos de VIH: tipo 1 y 2. Ambos difieren genéticamente en un 55%, y el VIH-1 es el más virulento, prevalente y responsable de la mayoría de los casos de este síndrome a nivel mundial, mientras que el VIH-2, es menos agresivo y se transmite con menor eficacia (Goede *et al*, 2014) (Visseaux *et al*, 2016) (Beloukas *et al*, 2016) (Kanti *et al*, 2014).

El diagnóstico de VIH se realiza mediante una prueba que detecta los anticuerpos producidos por el sistema inmune en respuesta al virus. Se recomienda esperar 3 meses después de una posible exposición, para realizar la prueba de VIH ya que existe un “período silente” de 2 meses en el cual, a pesar de una infección, los anticuerpos no serían detectados. Sin embargo, en ese mismo período, el paciente podría tener altos niveles del

virus en sangre, semen, fluidos vaginales o leche materna, pudiendo transmitir el virus aunque la prueba diagnóstica sea negativa (ONUSIDA, 2022).

En nuestro país, todo Servicio de Sangre y laboratorio clínico ya sea público o privado que obtenga un resultado reactivo para el tamizaje de VIH, debe enviar la muestra al Instituto de Salud Pública (ISP) para su confirmación. El Laboratorio de VIH/SIDA del ISP es el laboratorio nacional de referencia y cuenta con prestaciones tales como la confirmación diagnóstica de adultos y pacientes pediátricos, medición de carga viral y genotipificación. Si el resultado es positivo, el paso final del procedimiento (que incluye otras tomas de muestra analizadas bajo la misma técnica de tamizaje) es informar al paciente, por medio de personal debidamente calificado y entrenado en consejería de VIH. Cabe destacar que todos los kit comerciales usados para el tamizaje de VIH son evaluados en el ISP antes de su comercialización mediante un análisis técnico. Desde el año 2013, para que un ensayo comercial sea recomendado para Banco de Sangre y para Laboratorio Clínico, debe tener una sensibilidad del 100% y especificidad de 95%, lo cual es incorporado como requisito, desde el 2017, también para los test rápidos (visuales) en sangre total en Centros de Atención Primaria de Salud (ISPCh, 2022).

La infección por VIH-1 suele ser diagnosticada varios años después de la infección inicial ya que es una infección aguda autolimitada e inespecífica que se manifiesta entre 2 y 4 semanas después de la exposición al virus. En la ventana de tiempo entre la infección y antes de la positividad por anticuerpos, el VIH-1 puede ser aislado de diversos fluidos corporales tales como sangre, secreciones genitales y fluido cerebroespinal, y a partir de tejido linfoide. Entre los signos y síntomas presentados mayoritariamente por los pacientes en ese período se ha reportado fiebre, linfadenopatía, faringitis, rash, mialgia, fatiga, pérdida de peso y dolor de cabeza. Dada la característica de este cuadro en su inicio, es importante reforzar en el personal médico que, al observar estos signos y síntomas, se considere un posible diagnóstico de infección por VIH en población de riesgo.

Si bien el tiempo promedio desde la infección hasta desarrollar SIDA es de aproximadamente 8 a 10 años, algunos pacientes lo hacen en menos tiempo mientras que un porcentaje menor no tiene evidencia de inmunosupresión por más de 10 años. Por esta razón se escogen marcadores clínicos que permitan evaluar la progresión de la enfermedad, siendo el más importante la cuantificación de la carga viral como predictor de riesgo. (Guía Clínica Chilena de VIH, 2013).

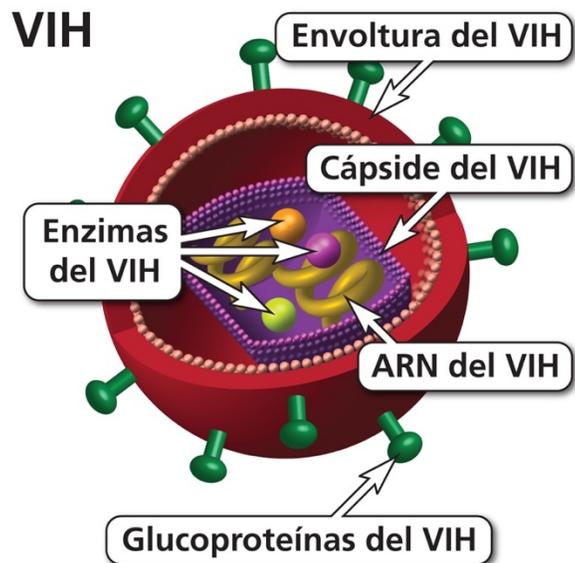


Figura 1. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana. Extraída de Clinical Info HIV.gov. U.S. Department of Health & Human Services.

Mecanismo de replicación: El primer paso del mecanismo de replicación del virus se da gracias a los receptores de quimioquina CCR5 y CXCR4 que corresponden a entradas celulares para el virus. Al unirse a esos receptores, se genera un cambio conformacional de la glicoproteína gp120 que favorece la interacción virus–membrana celular y finalmente la entrada (Berger *et al*, 2002). Luego se liberan dos moléculas de ARN vírico de la cápside y otras proteínas que son necesarias para los procesos de replicación e integración, al citoplasma de la célula. El proceso siguiente es la transcripción inversa: usa una molécula de ARN para sintetizar un ADN monocatenario, que luego es usado de molde para generar un ADN bicatenario. Este último se une con un complejo de preintegración, y viaja al núcleo para unirse al genoma de la célula aleatoria e irreversiblemente. En este paso la integrasa, enzima viral, lleva a cabo la integración del ADN del virus en el genoma de la célula, pudiendo este estar inactivo: se establece así la etapa latente de la infección. El siguiente paso es la migración del ARN hacia el citoplasma a través de poros nucleares, y la síntesis de proteínas mediada por la proteína Tat (aumenta la transcripción del ARNm) y Rev (proteína accesoria que participa en el transporte del ARN desde núcleo a citoplasma) (Cullen, 2003). Luego, en el citoplasma, se forman las partículas virales gracias a una proteasa, favoreciendo la maduración del virión y su liberación al espacio extracelular.

1.2 Epidemiología

Desde el comienzo de la pandemia del VIH 79,3 millones [55,9 millones – 110 millones] de personas contrajeron la infección y 36,3 millones [27,2 millones – 47,8 millones] fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. Hay que destacar que, a partir del año 2005, la mortalidad por SIDA ha disminuido y esto se atribuye principalmente al aumento en la disponibilidad de terapia antirretroviral (ONUSIDA, 2022).

Al año 2020, se estima en 37,7 millones [30,2 millones – 45,1 millones] la cantidad de personas que vive con el virus a nivel mundial y en 680.000 [480.000 – 1,0 millones] los casos de muertes a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. Del total de personas que viven con el virus 36,0 millones [28,9 millones – 43,2 millones] son adultos y 1,7 millones [1,2 millones – 2,2 millones] son niños de hasta 14 años. La **Figura 2** muestra la distribución geográfica de los casos de pacientes que viven con VIH y se observa la cifra más elevada en la zona este y sur de África con 20,6 millones [16,8 millones – 24,4 millones]. En Latinoamérica hay aproximadamente un 10% de los casos presentes en el área mencionada anteriormente, con 2,1 millones [1,4 millones – 2,7 millones] de casos. En general, se destaca la alta concentración de casos en el continente africano si se compara con la distribución en otras zonas geográficas del planeta. Ese mismo año sólo un 73% [56-88%] de todas las personas que vivía con el virus tuvo acceso al tratamiento.

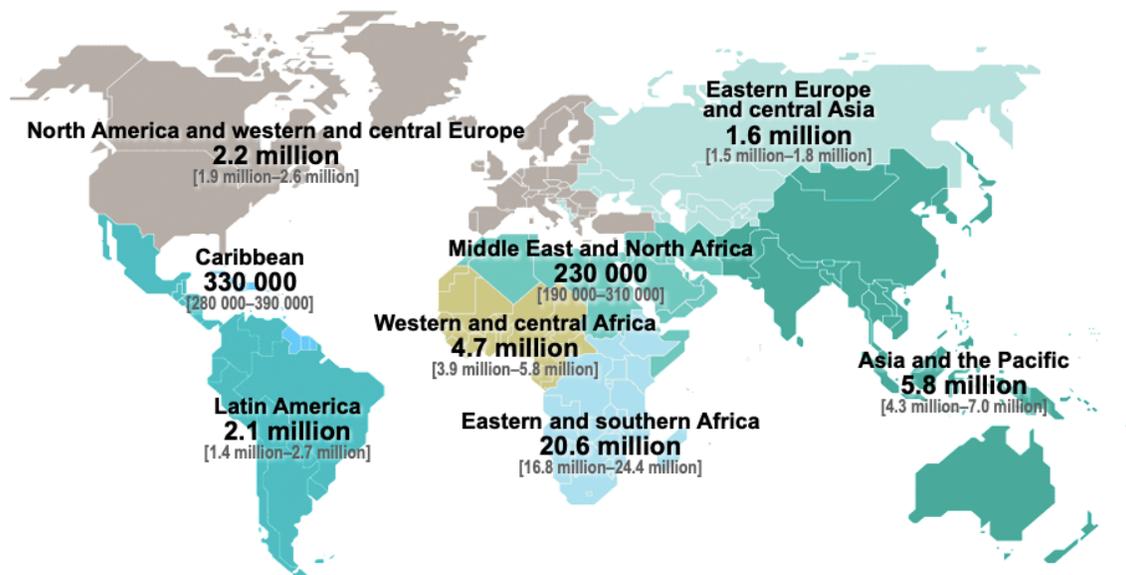


Figura 2. Pacientes que viven con VIH a nivel mundial al año 2020. Extraída de ONUSIDA.

Respecto a los casos nuevos, el año 1997 hubo un *peak* de nuevas infecciones de 3,0 millones [2,1 millones - 4,2 millones] que disminuye en un 52% comparado a la cantidad de nuevas infecciones del año 2020 correspondiente a 1,5 millones [1,0 millón – 2,0 millones]. Respecto al año 2010, con 2,1 millones [1,5 millones – 2,9 millones] de nuevos casos, igualmente se observa una disminución del 31% comparado con el año 2020 (ONUSIDA, 2022).

Según la meta propuesta por ONUSIDA de 90-90-90 a lograr al año 2020, a nivel mundial solo se logró un 84-73-66. Esto quiere decir que de todas las personas que viven con VIH, el 84% [67-98%] conocía su estado serológico, el 73% [56-88%] tenía acceso al tratamiento y el 66% [53-79%] tenía una carga viral indetectable (ONUSIDA Chile, 2022).

En lo que respecta al VIH en nuestro país, al año 2020 había 77.000 [68.000 – 86.000] personas que vivían con el virus y 5.000 [4.200 - 6100] nuevos casos (63% más casos comparado con las nuevas infecciones registradas el año 2010). Del total de personas que viven con el virus, 70.000 conocen su estado serológico (91%), 54.000 están con TAR (70%) y 49.000 (63%) tienen carga viral indetectable. Esto arroja que en nuestro país, en el año 2020, solo se cumplía con el “primer 90” de la estrategia propuesta por ONUSIDA (ONUSIDA Chile, 2022).

Dado el fracaso en el cumplimiento a nivel mundial, se propone en los mismos términos una estrategia del 95-95-95 para el año 2030 (ONUSIDA, 2021).

En Chile, la evolución en la población con VIH se ha podido evaluar en diversos estudios; uno de ellos detalla las características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes que han comenzado la TAR en Chile y su evolución en los últimos 15 años. La Cohorte Chilena de SIDA es una de las más numerosas y con mayor tiempo de seguimiento a nivel internacional y la más antigua de Latinoamérica (Beltrán *et al*, 2016).

Si bien en la actualidad los pacientes vieron alteradas sus atenciones médicas, siguen recibiendo la TAR, la cual está cubierta por GES-AUGE; acceden al tratamiento personas de cualquier edad que lo requieran. La ley chilena otorga 3 garantías a los beneficiarios: acceso a TAR, exámenes de monitoreo y oportunidad en el acceso y protección financiera. También el Ministerio de Salud posee un protocolo de Prevención de la Transmisión Vertical para embarazadas que viven con el VIH y sus hijos. En Chile, el primer protocolo para estas

situaciones se implementó el año 1996 e incluyó monoterapia de zidovudina (ZDV) para la embarazada durante el parto y al recién nacido. Luego, el año 2005, se implementó la primera Norma de Prevención de la Transmisión Vertical del VIH; incluyó test universal a las embarazadas, protocolo farmacológico a gestantes VIH (+) y sus hijos, y sucedáneo de leche materna hasta los 6 meses de edad (Gras, *et al.*).

Lo más importante es que los actuales tratamientos deben ser mantenidos de por vida, y cualquier interrupción de la terapia puede llevar a una rápida replicación del virus (Richman *et al.*, 2009).

1.3 Farmacoterapia en VIH

La TAR ha tenido un gran impacto asociando 3 fármacos antirretrovirales, combinación conocida como “TAR de alta potencia”, y es altamente efectiva en suprimir la replicación viral (Moore, *et al.*), permitiendo la recuperación cualitativa y cuantitativa de la respuesta inmune. Esto evita que el paciente progrese clínicamente a las etapas B o C de la enfermedad, reduce la mortalidad, pero no logra la erradicación del virus. Sin embargo, la eficacia de la TAR puede verse limitada cuando se inicia de forma tardía y/o por la aparición de toxicidad o resistencia viral a los medicamentos. Por esta razón es importante la individualización de la terapia de inicio y hacer cambios de esta terapia en caso de ser necesario.

La TAR está conformada por las siguientes familias de medicamentos, los cuales actúan sobre determinados puntos del mecanismo de replicación del virus:

- Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR)
- Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR)
- Inhibidores de la proteasa (IP)
- Inhibidores de la integrasa (INSTI por su denominación en inglés *Integrase Strand Transfer Inhibitor*).
- Inhibidores de fusión (IF)
- Antagonistas de los correceptores CCR5.

La fórmula generalmente aceptada para un régimen antirretroviral potente incluye 2 Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR) sumado a un tercero de otra familia (INNTR, INSTI o IP: efavirenz, dolutegravir o atazanavir respectivamente) (Ministerio

de Salud, 2013). Pero como todo tratamiento medicamentoso, no está exento de efectos adversos. Por esta razón, es que al iniciar la TAR, es importante manejar la evidencia clínica y el perfil de reacciones adversas al medicamento (RAMs) del tratamiento que será administrado.

Este proyecto incluye el análisis de las características metabólicas y variabilidad genética de dos fármacos utilizados en la TAR: efavirenz (EFV) y atazanavir (ATV).

1.4 Metabolismo de fármacos

Lo que el organismo es capaz de realizar sobre las moléculas de fármacos recibe el nombre de “farmacocinética” y estudia los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción; se puede obtener mucha información a partir del análisis de esos procesos (Urso *et al.*, 2002). Sobre el metabolismo, este ocurre principalmente a nivel hepático donde se concentra la mayor cantidad de enzimas del citocromo P450, un grupo de monooxigenasas responsables de la Fase I. Esta fase incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis; la Fase II se produce por conjugación con moléculas endógenas de carácter polar (ácido glucurónico, sulfatos, acetatos, glutatión).

El citocromo P450 recibe su nombre debido a la similitud con los citocromos mitocondriales, por poseer un grupo hemo y por absorber a 450 nm. Su función es catalizar la biotransformación de fármacos lipofílicos en moléculas más polares que se excretan por la orina. Estas modificaciones químicas generan, en su mayoría, metabolitos inactivos pero también ocurre la formación de moléculas que tienen una actividad farmacológica mayor. La actividad de una enzima del citocromo puede determinar la respuesta de un paciente a un fármaco. Si una de ellas es inhibida, resulta de interés clínico cuando genera un aumento de los niveles del fármaco en sangre y se asocia a efectos tóxicos. Por otro lado, si una enzima es inducida puede acelerar la biotransformación y disminuir la acción farmacológica o provocar ineficacia clínica. Basado en la información de la secuencia de aminoácidos, las enzimas del citocromo P450 tienen la siguiente nomenclatura: inicia con el prefijo “CYP” seguido de la familia en números arábigos, la subfamilia expresada en letras y otro número arábigo correspondiente al gen. En casos más específicos, se puede identificar una variante genética de esa enzima la cual se agrega al final de la nomenclatura explicada, con un asterisco. (Rodríguez, 2014; Spatzenegger, 1995).

Efavirenz (**Figura 3**) es un fármaco aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) el año 1998, el cual cuenta con una clínica bastante compleja, pero conocida por los médicos tratantes. Pertenece a la familia de los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa y es uno de los medicamentos más efectivos, pero alrededor del 50% de los pacientes presentan reacciones adversas (RAM) a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC). Estos efectos adversos se presentan durante las primeras semanas de tratamiento, pero pueden mantenerse por varios meses; esto lamentablemente afecta la calidad de vida y puede llevar a la suspensión de la TAR de manera unilateral por decisión de los pacientes (Gaida *et al*, 2016). Las principales reacciones adversas asociadas a este fármaco a nivel de SNC tienen aparición controversial lo que hace pensar en la interrogante de qué diferencia hay entre pacientes para que algunos presenten las RAMs y otros no. Los estudios en EFV han demostrado que existe una mejor relación entre los polimorfismos genéticos identificados en un paciente y los efectos adversos a la terapia; no así entre los niveles plasmáticos del fármaco y la aparición de RAMs donde se ha visto una alta variabilidad y resultados contrapuestos (Mattevi *et al*, 2017) y es precisamente en nuestro país, donde el estudio de una cohorte de pacientes resultó en la sugerencia, por parte de los autores, de realizar más investigaciones para demostrar clínicamente la funcionalidad de los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificados (Carr *et al.*, 2010; Cortés *et al.*, 2013). Esto ya que dicha variabilidad podría deberse en cierto grado a un componente genético, asociado a CYP2B6 (Lamorde *et al*, 2018). Un SNP es una variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando sólo un nucleótido es alterado y se considera una herramienta valiosa en el estudio del genoma humano. La aplicación de su análisis en enfermedades humanas permite explorar la influencia de polimorfismos genéticos en la susceptibilidad a enfermedades y en la sensibilidad/resistencia a fármacos (Sripichai y Fucharoen, 2007).

La **Figura 3b** muestra el metabolismo del fármaco a nivel hepático. Se puede observar que existen diferentes vías por las cuales esta molécula se hace más polar y la participación de diversas enzimas de biotransformación. La vía principal de metabolismo se da a través de CYP2B6 y origina su metabolito inactivo principal: 8-hidroxiefavirenz. Otras enzimas que participan en el proceso tales como CYP2A6 y CYP1A2 tienen un rol menor en el proceso. Es importante destacar que los fármacos pueden no necesitar un paso por ambas fases del metabolismo, siendo a veces suficiente con algunos cambios moleculares partes de una

fase para ser eliminados. Como se observa con EFV, puede seguir diferentes vías, siendo la principal una que requiere de ambas fases. Al existir competencia para la metabolización por CYP3A4, se puede producir inhibición de su metabolismo. Eso resulta en efectos adversos graves y/o mortales con fármacos como cisaprida, midazolam, triazolam entre otros (Dickinson *et al.*, 2010).

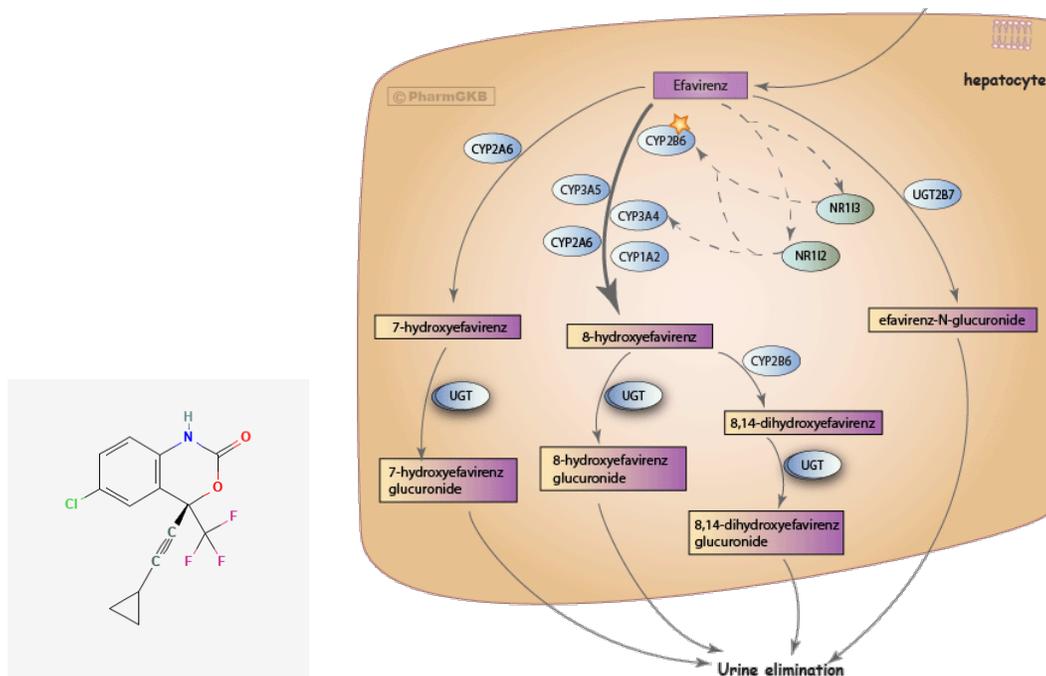


Figura 3. a) Estructura molecular de efavirenz y b) Metabolismo del fármaco a nivel hepático (PharmGKB).

Respecto a CYP2B6 es un gen altamente polimórfico con 38 variantes alélicas y múltiples subalelos conocidos. Los alelos son categorizados según su función la que se identifica mediante estudios *in vitro* con o sin información *in vivo*: función normal (CYP2B6*1), función disminuida (CYP2B6*6 y *9), sin función (CYP2B6*18) y función aumentada (CYP2B6*4). El alelo con función disminuida más estudiado es CYP2B6*6 (rs3745274) y se produce por una reducción en la expresión de la proteína debido a un *splicing* aberrante causado por un SNP en c.516G<T (Desta, 2019).

En relación a ATV (**Figura 4a**), un inhibidor de la proteasa, al comienzo había problemas con la posología ya que se obtenían concentraciones plasmáticas fuera del rango terapéutico y presentaban reacciones adversas. La situación mejoró al descubrir que

ritonavir, otro inhibidor de la proteasa, en dosis bajas actuaba como potenciador, aumentaba los niveles plasmáticos de atazanavir y mejoraba la eficacia (Zeldin, 2004). Es bien tolerado, pero entre el 5 y el 10% de los pacientes discontinúan el tratamiento debido a reacciones adversas. Además, presenta una gran variabilidad interindividual demostrada mediante la medición de niveles plasmáticos. Determinados estudios han asociado el nivel plasmático de ATV con la presencia de hiperbilirrubinemia, debido a que este fármaco inhibe el funcionamiento de la enzima UGT1A1, encargada de la conjugación de bilirrubina (Ma *et al*, 2007).

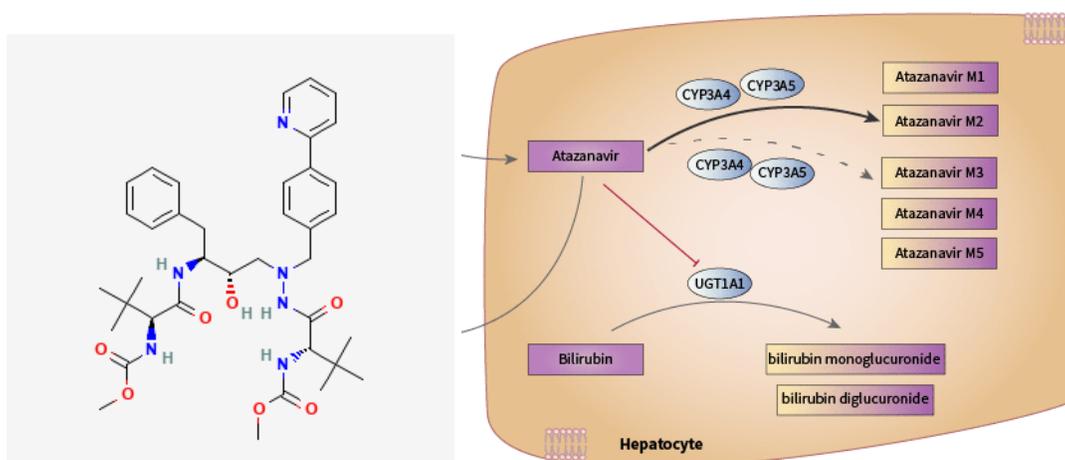


Figura 4. Estructura molecular de atazanavir y b) Metabolismo del fármaco a nivel hepático (PharmGKB).

Nuevamente se observa en este fármaco, que algunos pacientes desarrollan RAMs y otros no, lo que plantea la misma interrogante que en el caso de efavirenz. En el caso de atazanavir, si bien no se metaboliza por UGT1A1, se ha encontrado una relación indirecta para asociar un polimorfismo genético en esa enzima con el aumento de niveles de bilirrubina en los pacientes debido a la terapia (**Figura 4b**). Así, éste es otro caso donde se relaciona un polimorfismo con la aparición de reacciones adversas sin la necesidad de una medición de niveles plasmáticos del fármaco (Ma *et al.*, 2007).

Ambos fármacos incluidos en este estudio cuentan con Guías *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC), es decir, existen sugerencias de tratamiento en base a los genotipos del paciente en enzimas de interés para cada uno.

1.5 Factores que influyen en la respuesta a la Terapia Antirretroviral

La edad, el estilo de vida y la salud influyen también en la respuesta del organismo a los medicamentos y sus reacciones adversas, por lo que existe una alta variabilidad interindividual y son las reacciones adversas la principal explicación de la falta de adherencia al tratamiento poniendo en alto riesgo la capacidad de suprimir la carga viral en los pacientes. La adherencia a la TAR resulta esencial para el control de la infección, la reducción de la morbilidad y mortalidad, y la minimización del desarrollo de resistencias a los medicamentos (Santoro, 2013).

Por otro lado, como se ha mencionado, los genes también influyen en esta variabilidad interindividual lo que introduce en el área de la farmacogenómica, una disciplina que estudia cómo la composición genética (genoma) única de una persona influye en cómo responde a los medicamentos (Isaza *et al.*, 2009) y forma parte de la medicina de precisión, es decir, tiene como objetivo personalizar la atención médica con decisiones y tratamientos adaptados a cada individuo.

Según el reporte final del Taller de Latinoamérica de VIH, en Chile no existe un análisis genético previo al inicio de la terapia; solo ocurre cuando esta fracasa (Zitko *et al.*, 2016). Por esta razón, resulta interesante profundizar el conocimiento de la terapia evaluándola según características propias del fármaco, pero también del paciente. Para la última opción, la farmacogenómica es una herramienta que puede ayudar a optimizar la TAR al observar las variables genéticas que podrían estar determinando la respuesta y toxicidad de la terapia.

Por lo anteriormente expuesto resulta interesante combinar los conocimientos de la farmacogenómica y las reacciones adversas a medicamentos, y establecer una relación entre las bases genéticas y la aparición de estas RAMs. De esa manera se podría conducir la investigación de la TAR hacia el entendimiento de cómo una variante genética lleva a una diferencia en la terapia, cómo adaptarla cumpliendo así el objetivo de individualizar los tratamientos y cómo utilizar las herramientas disponibles para evitar la exposición de los pacientes a terapias que podrían generarle efectos negativos evitables.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo con la evidencia y antecedentes anteriormente señalados, el presente trabajo de tesis plantea la siguiente hipótesis de trabajo y objetivos.

2.1 Hipótesis de trabajo

La presencia de variantes genéticas en genes relacionados con EFV y ATV se asocia con la aparición de reacciones adversas producidas por el tratamiento antirretroviral con estos medicamentos en pacientes chilenos que viven con VIH.

2.2.1 Objetivo general

- Estudiar la relación entre variantes genéticas *CYP2B6*6*, *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* y *UGT1A1*28* y la aparición de RAMs producidas por el tratamiento antirretroviral con efavirenz y/o atazanavir en pacientes chilenos que viven con VIH.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2B6*6* y *UGT1A1*28* en población general chilena.
- Caracterizar clínica y socio-demográficamente a la muestra en estudio de pacientes que viven con VIH y que se encuentran en tratamiento con EFV o ATV.
- Identificar la relación entre las variantes genéticas *CYP2B6*6*, *CYP3A4*1B* y *CYP3A5*3* y los efectos adversos asociados a terapia con efavirenz.
- Identificar la relación entre el polimorfismo genético *UGT1A1*28* y los niveles de bilirrubina no conjugada en pacientes en terapia con atazanavir.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño del estudio para determinar frecuencia de CYP2B6*6 en población general chilena.

Para determinar las frecuencias de los SNPs rs3745274, rs2279345 y rs8192719, con objeto de sustentar el estudio en pacientes, se dispuso de 273 muestras de DNA genómico en cantidad y calidad necesaria para biología molecular (qPCR), las que corresponden a una muestra aleatoria de voluntarios chilenos, que se ha configurado en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Facultad de Medicina Campus Occidente de la Universidad de Chile, en el contexto de un “Banco de colección de ADN para estudios Farmacogenómicos en población general chilena”, autorizado por el Comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte.

Las muestras de DNA habían sido previamente purificadas de sangre periférica de los voluntarios sanos mediante el kit *Blood genomic DNA Extraction mini kit, ADN Favorgen®*.

La concentración de DNA resultante se determinó mediante espectrofotometría midiendo absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La pureza del DNA se evaluó a través de la fórmula (A260/A280) mayor a 1,7, siendo un valor óptimo entre 1,8 y 2,0 para la relación considerada aceptable.

El DNA genómico, aislado desde sangre periférica, fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando sondas *TaqMan®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que permiten realizar la discriminación alélica según la presencia del nucleótido específico mediante la amplificación de la región de interés del gen en cuestión.

La reacción de PCR fue estandarizada con el fin de determinar la cantidad de ADN y el volumen final de reacción que entregaran los mejores resultados. De los resultados de esta prueba se decidió utilizar 30 ng de DNA en un volumen final de 10 µL en cada pocillo.

Cada pocillo fue cargado con el volumen de muestra necesario para obtener la cantidad de 30 ng en el pocillo, posteriormente la placa completa fue incubada a 30° C durante toda la noche con la finalidad de “secar” el DNA en el pocillo. De esta forma el volumen de la muestra no influye en el volumen final de reacción.

Los protocolos de cada sonda fueron realizados según las recomendaciones del fabricante los cuales corresponden a:

- Etapa de activación por 10 min a 95° C, 50 ciclos 15 segundos a 92°C y 90 segundos a 60°C para la sonda rs3745274, rs8192719 y rs28399433.
- Etapa de activación por 10 min a 95°C, 40 ciclos 15 segundos a 92°C y 60 segundos a 60°C. para la sonda rs2279345

La PCR se realizó con 5 µL de 2× *TaqMan*® Universal PCR Master Mix, 0,5 µL de sonda *TaqMan*® 20X y 4,5 µL de agua nanopura.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Campana *Airclean 600 PCR Workstation*®
- Equipo PCR en tiempo *real Stragene MX3000P*®
- *Eppendorf Centrifuge 5415 R Arquimed*®
- *Eppendorf Mini spin Arquimed*
- *Vortex genie 2 Daigger*®
- *NanoDrop 2000 Spectrophotometer Thermo SCIENTIFIC*®
- *Mini plate Spinner MPS 1000 Labnet TCL*®

Se realizó un test para determinar si existe asociación en la repartición de alelos en la población o si su distribución sigue el modelo de Hardy-Weinberg, para esto se utilizó el programa SNPStats.

Este programa realiza el test de asociación con la cual, tomando como valor crítico 0,05 y comparando con el *p-value* que entrega el programa, permite discernir si se encuentra en equilibrio o no.

3.1.1 Determinación del porcentaje de mezcla aborígen/caucásica

Para establecer el nivel de mestizaje de la población estudiada, disponiendo del grupo sanguíneo de los participantes, se determinó el porcentaje de mezcla amerindio-caucásica (% M_{A-C}), a partir de la determinación del grupo sanguíneo de los voluntarios reclutados, el equilibrio de Hardy-Weinberg y la ecuación de Bernstein⁴² que define los alelos sanguíneos A, B y O de la siguiente manera:

$$\text{Si: } p + q + r = 1$$

$$\text{Donde } p = 1 - (F [B] + F [O])^{1/2} \quad [2]$$

$$q = 1 - (F [A] + F [O])^{1/2} \quad [3]$$

$$r = (F [O])^{1/2} \quad [4]$$

Siendo F las frecuencias alélicas de cada grupo. Entonces se determina la desviación (D) de cálculo y se obtienen los valores específicos de la frecuencia alélicas a partir de:

$$D = 1 - (p + q + r)$$

$$p' = p (1 + (D/2)) \quad [5]$$

$$q' = q (1 + (D/2)) \quad [6]$$

$$r' = (r + D/2) (1 + D/2) \quad [7]$$

Siendo q', p' y r' los valores corregidos de las frecuencias alélicas.

Finalmente se establece el % M_{A-C} a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MA} - \text{C} = \frac{[\text{F. Población}] - [\text{F. Españoles}]}{[\text{F. Indígena}] - [\text{F. Españoles}]}$$

Donde F. Indígena determinadas para cada grupo sanguíneo son: A=0,0678, B=0 y O=0,9322 y F. Española determinada para cada grupo sanguíneo son: A=0,2864, B=0,670 y O=0,6465

Para el análisis de correlación entre los genotipos obtenidos para los SNPs estudiados en el gen CYP2B6, se aplicó el coeficiente de contingencia Cramér's ("V") para variables nominales, también llamado coeficiente de contingencia de Pearson, utilizando el programa STATA V12.

3.2 Diseño del estudio para determinar frecuencia de UGT1A1*28 en población general chilena

Se extrajo de cada individuo sangre en un tubo con anticoagulante EDTA en condiciones estériles con un sistema al vacío (Vacutainer®), con un volumen estándar de 3 mL aprox., tanto para la extracción de DNA, como para la tipificación del grupo sanguíneo ABO asegurando el estricto cumplimiento de las normas de bioseguridad para la toma de muestra y desecho de material contaminado y corto punzante para resguardar el bienestar de las personas involucradas.

Para resguardar la confidencialidad de los resultados (Ley N° 19.628 y Ley 20.584), las muestras no fueron almacenadas con el nombre de los involucrados, sino que mediante un sistema de codificado (ID).

Todos los datos recopilados de los donantes voluntarios fueron almacenados en una base de datos con clave de acceso en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la tutela y responsabilidad del investigador principal, Dr. Luis Quiñones S.

Este estudio se sustenta éticamente en la obtención de muestras de DNA genómico de individuos mayores de edad, quienes aceptaron voluntariamente y mediante consentimiento informado donar su muestra para la "Configuración de un banco de colección de ADN para estudios farmacogenómicos en población general chilena", el cual fue aprobado por el Comité de ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte, Ministerio de Salud, Chile. El laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética, ya posee más de 350 muestras de DNA genómico de voluntarios chilenos.

Este estudio consideró un $n = 340$, obtenido a partir de la fórmula para cálculo del tamaño de muestra, estableciendo 0,33 como la frecuencia esperada para el alelo UGT1A1*28 (Gammal, 2015) en población chilena y un estimado del tamaño total de la población chilena en 17 millones con un intervalo de confianza de 95% y porcentaje de error de 5%.

La extracción de DNA se realizó por duplicado desde las muestras de sangre periférica, para esto se utilizarán kits comerciales (FavorPrep™), que permiten la obtención de DNA

de forma simple, rápida, reproducible y con una pureza adecuada para realizar amplificaciones por PCR. Las muestras de DNA genómico se almacenaron a -20°C.

El DNA genómico se cuantificó utilizando el equipo Denovix DS-11 FX *Series Spectrophotometer*. La relación de absorbancias 260/280 nanómetros, se utilizó para evaluar la pureza del DNA, un valor superior a 1,7 se consideró como aceptable.

La determinación de los SNPs del gen UGT1A1 se realizó mediante discriminación alélica utilizando sondas TaqMan que presentan las siguientes secuencias contexto indicado en **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de secuencias blanco para detección de ambos SNPs.

ID SNP	Fluoróforo (base que discrimina)	Secuencia contexto
rs887829	VIC (C)	TTCTAAAAGCCTTCTGTTTAATTT[C/T]TGGAAA AGAAGCCTAACTTGTTAC
	FAM (T)	
rs6742078	VIC (G)	TGTGGGTTACTGGGAATGCGTGATG[G/T]TGAA GTCACAGATGACCCACATGGT
	FAM (T)	

Las muestras fueron genotipificadas empleando una mezcla de reacción consistente en 5,4 µl del master mix (2X), provisto por el kit *TaqMan® Genotyping Master Mix*, 0,54 µl de sonda (20X) y 30 ng de DNA genómico. Cada grupo de muestras se analizó en conjunto con dos controles negativos, una muestra control con el alelo silvestre y otra muestra control para el genotipo heterocigoto y homocigoto mutado.

El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturalización a 92°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 90 segundos y de extensión a 72°C por 60 segundos.

La genotipificación fue realizada por adaptación de la técnica PCR-SSCP (Polimorfismos de Conformación de Cadena Simple) de acuerdo con una adaptación del método de Trontelj *et al.*, 2009. Se realizó la amplificación de la región del promotor que incluye la caja TATA, mediante la PCR (partidores Directo: 5'-TGA AAT TCC AGC CAG TTC AA-3' y Reverso: 5'-AGA GGT TCG CCC TCT CCT AC-3'). Se amplificó la región promotora del gen humano

UGT1A1. Se utilizó una mezcla de reacción de PCR compuesta por DNA genómico (5µL), *MyTaq reaction buffer* (5 µL), 1,2 unidades de enzima *MyTaq®* (0,4 µL). El programa de PCR consta de una desnaturalización inicial a 97°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 56,5°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Este último paso seguido de una extensión final a 72°C por 3 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,2% para comprobar amplificación.

El análisis SSCP se realizó luego de la amplificación, el producto PCR (6µL) se mezcló con una solución de desnaturación: (15 µL) de formamida 95%, EDTA 20mM y azul de bromofenol 0,05%. Luego la mezcla se incubó a 95-97°C por 3 minutos, y se enfrió inmediatamente en hielo. Se cargaron 9 µL del volumen total del producto desnaturalizado en gel de poliacrilamida (30:1) al 18%. La electroforesis fue corrida a 20W y 70V por aproximadamente 5 horas.

El proceso de tinción con plata corresponde a una adaptación del método descrito por Bassam *et al*, esta incluye una secuencia de pasos como indica la **Tabla 2**. Primero fijación con etanol, lavado con agua de alta pureza, seguida de una impregnación con nitrato de plata, lavado con agua de alta pureza, revelado con una solución compuesta por formaldehído, carbonato de sodio y tiosulfato de sodio y detención de la reacción de reducción con ácido acético.

Tabla 2. Protocolo de tinción con Nitrato de Plata (AgNO₃) para análisis de polimorfismos de cadena simple (SSCP).

Paso	Procedimiento (solución utilizada)	Tiempo	Consideraciones
Fijación	Etanol 10% (80 mL)	De 30 a 60 minutos	La fijación de las muestras es eficiente entre 30 y 60 minutos.
Lavado	Agua de alta pureza (80 mL)	De 20 a 30 segundos (2 veces)	Recomendable cambiarse guantes para no contaminar
Tinción	Solución de Nitrato de plata (100 mL): -0,1g AgNO ₃ -150 µL de formaldehído -Completar a 100 mL con agua destilada	30 minutos	Debe realizarse en fotoprotección

Lavado	Agua de alta pureza (80 mL)	De 10 a 15 segundos (2 veces)	Paso crítico: si se lava por mucho tiempo, se pierde la tinción. Si se lava muy poco el exceso de solución de tinción enmascara las bandas
Revelado	Solución de revelado (100 mL): -2,3 g de Na ₂ CO ₃ -1 mg de Na ₂ SO ₄ ·5H ₂ O -150 µL de formaldehído	Variable, de 3 a 10 minutos	Debe hacerse con exposición controlada a la luz, de lo contrario puede haber exceso de revelado y enmascarar resultados
Detención	Ácido acético 10%	Más de 24 horas	Los geles pueden ser guardados varios días después de teñidos.

El genotipo se determinó según el patrón de bandas obtenido para las muestras, el cual se comparó con un estándar de tamaño de DNA (HyperLadder®) y muestras control, con el fin de definir la presencia de genotipo homocigoto silvestre *UGT1A1**1/*1 (TA 6/6), heterocigoto *UGT1A1**1/*28 (TA 6/7) u homocigoto para el alelo *UGT1A1**28/*28 (TA 7/7) como se esquematiza en la **Figura 5**.

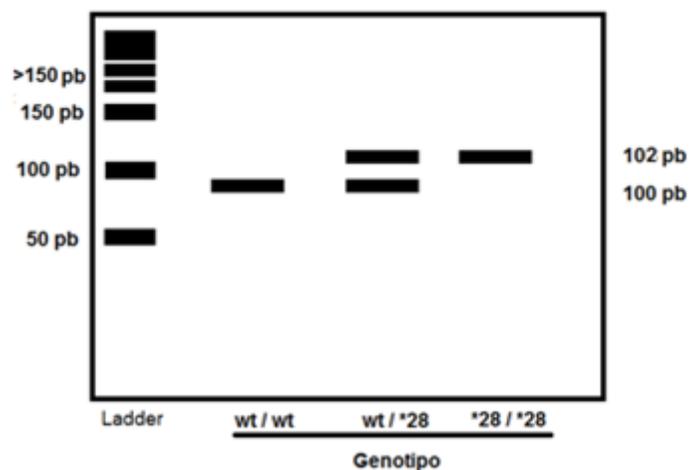


Figura 5. Representación esquemática de los patrones de bandas, tras la tinción con nitrato de plata.

3.2.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg y tipificación de grupo sanguíneo para análisis de porcentaje de mezcla amerindio-caucásica

Una de las relaciones fundamentales de la genética de poblaciones se expresa por la afirmación: en una población muy grande, el apareamiento al azar entre dos alelos A y A' se producen en frecuencias similares al cuadrado del binomio, donde $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, en ausencia de mutación o selección. Por esta razón, se estudió si la distribución de los SNPs y alelos cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, en la población estudiada.

Se realizó la clasificación del grupo sanguíneo ABO en los individuos del grupo a estudiar, para lo que se utilizaron antisueros comerciales Anti-A y Anti-B para la determinación directa de grupo ABO, con el fin de caracterizar la mezcla amerindio caucásica de la muestra poblacional.

Para determinar el porcentaje de mezcla amerindio-caucásica (%M_{A-C}), que permite establecer el nivel de mestizaje de la población, se determinó el grupo sanguíneo a todos los voluntarios y luego se calculó la frecuencia alélica para el sistema ABO, mediante al equilibrio Hardy-Weinberg (ecuación 1-3) y ecuación de Bernstein (ecuación 4-9) [Acuña M, *et al*, 2000] como se describe a continuación:

$$p^2 + 2pr + r^2 = (p + r)^2 = F [A] + F [O] \quad (1)$$

$$q^2 + 2qr + r^2 = q^2 = F [B] + F [O] \quad (2)$$

$$r^2 = F[O] \quad (3)$$

$$p = 1 - \sqrt{(F [B] + F [O])} \quad (4)$$

$$q = 1 - \sqrt{(F [A] + F [O])} \quad (5)$$

$$r = \sqrt{F [A]} \quad (6)$$

$$p' = p \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (7)$$

$$q' = q \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (8)$$

$$r' = \left(r + \frac{D}{2}\right) \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (9)$$

Ecuación 1 a 2, Equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema ABO, donde $F[A]$, $F[B]$, $F[O]$ es la frecuencia alélica para A, B y O, respectivamente. Luego al despejar p y q , se obtienen las ecuaciones de la 4 a la 6 para simplificar los cálculos. Entonces, si $(p + q + r) = 1$, y se corrige la desviación $D = 1 - (p + q + r)$ (ecuación 8-10).

Al reemplazar en las ecuaciones 5 a 7 con las frecuencias de A, B y O y calcular D. Luego, reemplazar en ecuaciones 8 a 10 se obtiene la frecuencia alélica para A, B y O de la población estudiada. Finalmente, se reemplazó la frecuencia alélica en la ecuación 10.

$$\% M_{A-C} = \frac{|F.\text{población estudio}-F.\text{españoles}|}{|F.\text{mapuches}-F.\text{españoles}|} \quad (10)$$

Donde F. es la frecuencia alélica, F. Mapuche es igual a 1, F. Española es igual a 0,6465.

3.2.2 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento se expresa usando las frecuencias gaméticas. Si los genotipos tienen dos loci con alelos $A_1 A_2$ y $B_1 B_2$, entonces habrá cuatro tipos de gametos ($A_1B_1 A_1B_2 A_2B_1 A_2B_2$) y la población estará en equilibrio si los gametos se combinan al azar. El “valor D”, medida propuesta por Lewontin y Kojima (1960) que va desde 0 hasta 1 y cuantifica el desequilibrio de ligamiento como la diferencia entre la frecuencia de co-ocurrencia de un alelo en el locus A con los alelos en el locus B y la frecuencia de co-ocurrencia esperada en equilibrio de ligamiento, como se detalla en la **Tabla 3**.

			A	
			A_1	A_2
			p_A	q_A
B	B_1	p_B	$p_A p_B (r)$	$q_A p_B (t)$
	B_2	q_B	$p_A q_B (s)$	$q_A q_B (u)$

Tabla 3: Matriz para calcular el “Valor D” para alelos en los loci A y B

En la tabla se esquematiza las frecuencias de los posibles gametos, asignándose una letra para cada frecuencia, si las frecuencias están en equilibrio, ambos tendrán el mismo “valor D”

$$D = ru - st \quad \text{o} \quad D = (p_A p_B q_A q_B) - (p_A q_B q_A p_B).$$

La medida de r^2 propuesta por Hill y Robertson en 1968 se obtiene mediante el cálculo

$r^2 = D^2 / (p_A q_B * q_A p_B)$. Es una variable dependiente de la frecuencia alélica que puede tomar valores de 0 a 1 e indica el grado de redundancia entre dos alelos que presenten desequilibrio de unión. Un $r^2 = 1$ indica un ligamiento completo.

3.3 Diseño del estudio para caracterizar a la población chilena que vive con VIH

Se realizó un estudio epidemiológico, de tipo caso-control y observacional corresponde al estudio de una cohorte retrospectiva de pacientes mayores de edad (18 años o más) con diagnóstico de VIH atendidos en el Policlínico de Infectología del Hospital San Juan de Dios (HSJD), con uso de EFV o ATV como parte de su TAR. Se consideró a la variante genética de riesgo como factor de exposición. Se realizó revisión de fichas clínicas y de exámenes de laboratorio; esto permite identificar a los pacientes en los cuales hubo cambio de terapia de uno de los medicamentos involucrados en el estudio, que pueda sugerir alguna característica genética de interés. En estos casos, y siempre que el paciente se siga atendiendo en el hospital, se realiza un análisis genético mediante una muestra de sangre obtenida y tratada inicialmente en dependencias del centro y analizada genéticamente en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Facultad de Medicina, Campus Occidente, de la Universidad de Chile. Actualmente el HSJD tiene un registro total de 3752 pacientes con VIH; sumados los pacientes que reciben su terapia y quienes no. Todos son parte de un programa ministerial, donde el Químico farmacéutico (QF) a cargo de abordar la terapia realiza atención farmacéutica cada 3 a 6 meses por paciente y valida las reacciones adversas de cada paciente mediante Algoritmo de Naranjo (Naranjo *et al*, 1981) según lo expresado en la Guía Clínica Chilena de VIH. El reclutamiento de pacientes en TAR con EFV y ATV inició en el mes de junio de 2019 y tuvo una interrupción abrupta como resultado de la pandemia, la cual no permitió aumentar marcadamente la cantidad de pacientes incluidos. Las muestras obtenidas tuvieron un análisis genético.

3.3.1 Criterios de selección

3.3.1.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes de 18 años o más.
- Pacientes con administración de EFV o ATV
- Pacientes categoría clínica A1, A2, B1 y B2 según Guía Clínica Chilena de VIH (2013).
- Pacientes que accedan a firmar el consentimiento informado.

3.3.1.1 Criterios de Exclusión:

- Pacientes con falla renal o hepática previa a tratamiento antirretroviral.
- Pacientes VIH positivos, con recuento de linfocitos CD4+ menores de 200/mm³.
- Pacientes sin información clínica disponible requerida por el trabajo de tesis.

3.3.2 Tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral se utilizó *Genetic Association Study (GAS) Power Calculator* considerando la reacción adversa menos frecuente (2% reportado en EFV), la frecuencia alélica menor (0,055 para CYP3A4*1B), una significancia estadística de 0,05 y potencia del 80%. El estimado fue de 240 pacientes en total.

3.3.3 Información a recolectar

La información recopilada fue organizada en una base de datos codificada y contiene los siguientes datos: Identificación del paciente (codificación utilizada en la práctica clínica del hospital: inicial del nombre (primer nombre, ambos apellidos) + fecha de nacimiento + últimos 4 dígitos del RUT), número de ficha, edad (años), recuento de linfocitos (células/mm³), carga viral (copias/mL), transaminasas hepáticas (U/L), nivel de bilirrubina (mg/dL; para pacientes con ATV), y niveles de creatinina sérica (mg/dL). En el caso de los pacientes en tratamiento con ATV se registraron valores de bilirrubina sérica, recuento de linfocitos y carga viral previos y posteriores al inicio de la terapia. La realidad clínica del HSJD sugiere que idealmente por cada paciente existirá, al menos, un nivel de creatinina basal, luego a las 4 semanas otra medición y finalmente un nivel de creatinina a los 3, 4 ó 6 meses de iniciada la terapia. La tercera medición es variable según las horas de atención y problemáticas propias de la práctica clínica.

Las reacciones adversas a medicamentos de interés para ATV son hiperbilirrubinemia y la aparición de ictericia; para EFV se considera la toxicidad a nivel de sistema nervioso central.

3.3.4 Obtención y tratamiento de muestras sanguíneas

Se obtuvo una muestra de sangre de 5 mL en un tubo *Plus Hemogard* EDTA tapa lila específicamente diseñado para venopunción en condiciones estériles desde el HSJD considerando todas las medidas de bioseguridad necesarias para evitar riesgos tanto para el donante como para la persona que tomó la muestra. La muestra fue inmediatamente refrigerada a 4-8 °C hasta su centrifugación. Este procedimiento fue realizado por Enfermeras Universitarias o Tecnólogos Médicos. Luego la muestra fue centrifugada a 5.000 rpm a 5°C durante 15 minutos. Posteriormente se retiró cuidadosamente 250 µL de capa leucoplaquetaria dispuesta en la interfase la cual será depositada en un tubo eppendorf rotulado debidamente. La muestra de *buffy coat* se congeló a -80 °C hasta el momento de la extracción de ADN, en el laboratorio CQF. Para evitar posibles contaminaciones en el ambiente laboral, todo el material desechable que entró en contacto con la sangre fue eliminado en bolsas de eliminación color rojo para citotóxico.

Para la determinación de variantes se utilizó la técnica de PCR en tiempo real por tecnología *TaqMan*®, mediante el Kit *TaqMan*® *SNP Genotyping Assay Search*, de *Thermo Fischer Scientific Inc.*®. La PCR se realizó con una mezcla de reacción que contenía: *TaqMan*® *Genotyping Master Mix 2X*, mix 20X (conteniendo las sondas y partidores respectivos), agua grado biología molecular, libre de nucleasas, y ≥ 30 ng de DNA genómico de cada muestra. El mix para PCR se realizó bajo campana de bioseguridad y, previo a esto, se realizó un protocolo de limpieza y descontaminación establecido en el Laboratorio Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Facultad de Medicina, Campus Occidente, de la Universidad de Chile.

Para el análisis genético se estudiaron las variantes genéticas más relevantes para cada fármaco cuyas características se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Variantes genéticas a evaluar según fármaco.

	CYP2B6*6	CYP3A5*3	CYP3A4*1B	UGT1A1*28
rs	3745274	776746	2740574	8175347
Localización	Exon 4	Intrón 3	Región promotora 5'	Promotor TATA
Variante	516G>T	6986A>G	-392A>G	TA (TA) 7
	Alteración	Alteración		Transcripción
Efecto	Splicing	Splicing	Transcripción alterada	alterada: Eficiencia reducida
	mRNA	mRNA		
Consecuencia funcional enzima	Actividad reducida	Actividad reducida	Actividad reducida	Actividad reducida

Efavirenz

Atazanavir

3.3.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de cada variable. En el caso de las variables continuas se estableció la media, la moda y mediana. Las variables categóricas se organizaron mediante tablas de frecuencia. Posteriormente, se creó una tabla que describe las características de la muestra. Se determinó la asociación individual de cada variante genética con cada reacción adversa a medicamentos recopilado de la información obtenida a partir de las fichas, es decir cada RAM representa un *outcome*. Para ello se utilizó análisis de regresión logística univariada. Aquellos pacientes clasificados como casos se codifican como 1 y aquellos pacientes clasificados como controles se les codifican como 0. Las variantes genéticas se analizaron en tres modelos de herencia: modelo codominante, dominante y recesivo. Aquellas variables con un p-value de $\leq 0,2$ en el análisis univariado, se incorporaron en una regresión logística múltiple utilizando el método *stepwise regression, forward selection*, con un criterio de permanencia de $p < 0,05$ para llegar a un modelo final. Cuando individualmente dos o más variables genéticas lograron asociarse con

una RAM específica, se incorporaron en un mismo modelo siempre cuando el *p-value* de cada una en el modelo múltiple sea significativo. Las variables cuantitativas se trataron como tal, o bien como variable dicotómica, categorizada en dos respecto a la media, o bien como variable *dummy*. El modelo multivariado final, fue aquel donde las variables independientes que explican el *outcome* fueron significativas y que el modelo fue significativo con el mayor pseudoR² posible. La significación estadística se estableció con $p < 0,05$. El paquete estadístico utilizado fue R.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados del estudio para determinar frecuencia de CYP2B6*6 en población general chilena.

4.1.1 Muestra estudiada

Se analizaron un total de 273 muestras de DNA, obtenidas desde el “Banco de colección de ADN para estudios Farmacogenómicos en población general chilena” del laboratorio CQF. El rango etario de los voluntarios al momento de la toma de muestra fue de 18-65 años, con un promedio de $27 \pm 8,3$ años. La muestra estaba constituida por 139 (51,1%) mujeres y 134 (48,9%) hombres.

4.1.2 Determinación del % de mezcla aborigen/caucásica de la población estudiada

En la base de datos del laboratorio había registro del grupo sanguíneo ABO de 180 muestras lo que corresponde al 66,2% del total analizado. En el desglose de grupo sanguíneo encontramos un 28,3% del grupo A, un 14,4% del grupo B, un 56,1% del grupo O y un 1,1% del grupo AB. El porcentaje de mestizaje encontrado en esta población según las frecuencias del grupo ABO es de un 33,63%.

4.1.3 Frecuencias génicas y alélicas de los rs3745274, rs2279345 y rs8192719 del gen CYP2B6

Como se muestra en la **Tabla 5** se pudo genotipificar el 97,79% de muestras para el polimorfismo rs8192719, la frecuencia del alelo C (ancestral) fue de 0,62, mientras que para el alelo T fue 0,38. Este polimorfismo se encontró en equilibrio de *Hardy-Weinberg* con un p-value de 0,24.

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs8192719.

rs8192719	Genotipos	n	%	Alelos	n	f
	C/C	108	0,41	C	332	0,62
	C/T	116	0,44			
	T/T	42	0,16	T	200	0,38
	Total	266	100	Total	532	1,00

Para el polimorfismo rs2279345 se logró genotipificar el 94,12% de las muestras donde se encontró una frecuencia para el alelo C de 0,8 y para el alelo T de 0,2. Este polimorfismo también se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg con un p-value de 0,43.

Tabla N° 6. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs2279345.

rs2279345	Genotipos	n	%	Alelos	n	f
	C/C	167	0,65	C	411	0,80
	C/T	77	0,30			
	T/T	12	0,05	T	101	0,20
	Total	256	100	Total	512	1,00

El polimorfismo rs3745274 pudo ser genotipificado en el 91,91% de las muestras analizadas, encontrándose el alelo G con una frecuencia de 0,76, mientras que el alelo T posee una frecuencia de 0,24. Este polimorfismo no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg con un p-value <0,0001.

Tabla N° 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs3745274

rs3745274	Genotipos	n	%	Alelos	n	f
	G/G	162	0,65	G	378	0,76
	G/T	54	0,22			
	T/T	34	0,14	T	122	0,24
	Total	250	100	Total	500	1,00

4.1.4 Correlación de los genotipos obtenidos para los SNPs del gen *CYP2B6* estudiados

En las **tablas 8 a 10** se observan los resultados de los cálculos del coeficiente de contingencia de Cramers "V" (o de Pearson) para variables nominales, en este caso los genotipos. Los valores para este coeficiente, van de 0 a 1, donde 0 significa que no hay relación, valores mayores a 0,5 se interpretan como una correlación relativamente importante, y 1 señala una relación perfecta entre las variables.

Tabla 8. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers ("V") o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs3745274 y rs2279345.

	rs3745274			
rs2279345	GG	GT	TT	Total
CC	87	36	32	155
CT	59	15	0	74
TT	11	0	0	11
Total	157	51	32	240

$$V = 0,24$$

Tabla 9. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers ("V") o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs3745274 y rs8192719.

	rs3745274			
rs8192719	GG	GT	TT	Total
CC	99	1	0	100
CT	57	52	1	110
TT	2	1	33	36
Total	158	54	32	246

$$V = 0,76$$

Tabla 10. Determinación del coeficiente de contingencia de Cramers (“V”) o Pearson para los genotipos correspondientes a los SNPs rs2279345 y rs8192719.

	rs2279345			
rs8192719	CC	CT	TT	Total
CC	49	38	12	99
CT	79	36	0	115
TT	36	0	0	36
Total	164	74	12	250

$$V = 0,29$$

4.1.5 Evaluación de los desequilibrios de ligamiento (D´) reestimados en población de pacientes chilenos, para los resultados obtenidos en el presente estudio.

Cálculo de la medida de desequilibrio de ligamiento estandarizado (D´) se logra por la aplicación de la siguiente formula:

$$D' = D / D_{\text{máx}}$$

Donde

D_{máx}= mínimo valor de (p1q2) o (p2q1), cuando D es positivo, o

D_{máx}= máximo valor de -(p1q1) o -(p2q2), cuando D es negativo

Considerando los resultados podemos determinar los valores para p1 y p2 (frecuencias alélicas del SNP 1), y q1 y q2 (frecuencias alélicas para el SNP 2). De esta forma se puede obtener el valor de D.

$$D = D' \times (p1q2) \text{ o } (p2q1)$$

El cálculo de D se realiza aplicando la siguiente formula:

$D = X_{11} - p1q1$, donde X11 es la frecuencia observada del haplotipo y p1q1 es la frecuencia esperada del haplotipo y que es estimada por las frecuencias alélicas de los SNP 1 y 2.

Dado que D corresponde a la desviación entre estas dos frecuencias, si los dos locus están en equilibrio de ligamiento entonces $D = 0$; cuando D es distinto de 0, los locus no están en desequilibrio de ligamiento.

De esta forma podemos estimar la frecuencia esperada para el haplotipo en estudio

$$X_{11} = D + p_1q_1$$

En la **Tabla 11**, se observan los valores de D' determinados para el ligamiento de los SNPs del gen *CYP2B6*, a continuación, se verificó si dichos grados de ligamiento dan cuenta de las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en el presente estudio.

Tabla 11. Medida relativa de desequilibrio de ligamiento (D') para tres SNPs del gen *CYP2B6*, obtenido de un análisis de haplotipos en pacientes chilenos sometidos a Terapia Antirretroviral.

SNPs del gen <i>CYP2B6</i>	Valor de D' (n=219)
Rs3745274 (G) con rs8192719 (C)	0,94
Rs3745274 (G) con rs2279345 (C)	0,86
Rs2279345 (C) con rs8192719 (T)	0,92

Datos extraídos de Carr *et al.*, 2010.

4.1.5.1 Para los rs3745274 y rs8192719 se tiene un $D' = 0,94$

$D = D' \times p_2q_1$, donde p_2 es la frecuencia (f) del alelo T del rs3745274 (0,24) y q_1 es la f del alelo C del rs8192719 (0,62), y tiene un valor (0,1488) menor a p_1q_2 (0,2888)

$$D = 0,94 \times 0,1488$$

$$D = 0,13987$$

Con este valor para D se aplicó la fórmula para estimar la frecuencia del haplotipo GC (X_{11}) para los rs3745274 y rs8192719.

$$f \text{ haplotipo GC} = D + p_1q_1$$

donde p_1q_1 es igual a la f del alelo G de rs3745274 multiplicado por la f del alelo C del rs8192719 (0,4712)

$$f \text{ haplotipo GC} = 0,13987 + 0,4712$$

f haplotipo GC = 0,611

Utilizando la f del haplotipo GC y las frecuencias indicadas en la tabla 8 se puede estimar las frecuencias de los cuatro haplotipos posibles. No es posible estimar las f de estos haplotipos sólo con las frecuencias génicas de ambos SNPs, ya que los posibles haplotipos obtenibles del análisis de los heterocigotos de ambos SNPs, tienen dos posibilidades imposibles de determinar. Sin embargo, al tener la f del haplotipo GC podemos estimar la f de haplotipos presente en los heterocigotos.

$$f \text{ haplotipo GC} = 2x99 + 57 + 1 + X / 492$$

$$0,611 \times 492 = 300$$

$$X = 44$$

Por ende, los 52 individuos constituidos por los genotipos GT (rs3745274) y CT (rs8192719), 44 deberían ser GT/CT (generando 44 haplotipo GC y 44 haplotipos TT) y 8 ser GT/TC (generando 8 haplotipos GT y 8 haplotipos TC).

Las f de los cuatro haplotipos posibles sería la siguiente, considerando las frecuencias genotípicas obtenidas en este trabajo:

$$G/C = 2x99 + 57 + 1 + 44 / 492 = 300/492 = 0,61$$

$$G/T = 57 + 2 + 2 + 8 + 1 / 492 = 70/492 = 0,14$$

$$T/C = 1 + 8 + 1 / 492 = 10/492 = 0,02$$

$$T/T = 44 + 2 + 1 + 2x33 / 492 = 113/492 = 0,23$$

Este análisis permite verificar que el D' estimado por Carr *et al* explica las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en la población estudiada en el presente trabajo. Por ende, los SNPs rs3745274 y rs8192719 se encuentran en desequilibrio de ligamiento de acuerdo con su medida ($D' = 0,94$).

4.1.5.2 Para los SNPs rs8192719 y rs2279345 se tiene un $D' = 0,92$

$D = D' \times p_2q_1$, donde p_2 es la frecuencia (f) del alelo T del rs8192719 (0,38) y q_2 es la f del alelo T del rs2279345 (0,2), y tiene un valor (0,076) menor a p_1q_2 (0,496)

$$D = 0,92 \times 0,076$$

$$D = 0,0699$$

Con este valor para D se aplica la fórmula para estimar la frecuencia del haplotipo CT (X11) para los SNPs

$$f \text{ haplotipo CT} = D + p_1q_1$$

donde p_1q_1 es igual a la f del alelo C de rs2279345 multiplicado por la f del alelo T del rs8192719 (0,304)

$$f \text{ haplotipo CT} = 0,0699 + 0,304$$

$$f \text{ haplotipo CT} = 0,374$$

Utilizando la f del haplotipo CT y las frecuencias indicadas en la tabla 9 podemos estimar las frecuencias de los cuatro haplotipos posibles.

$$f \text{ haplotipo CT} = \frac{2 \times 36 + 79 + X}{500}$$

$$0,374 \times 500 = 187$$

$$X = 36$$

Por ende, los 36 individuos constituidos por los genotipos CT (rs2279345) y CT (rs8192719), todos deberían ser CT/TC (generando 36 haplotipos CT y 36 haplotipos TC).

Las f de los cuatro haplotipos posibles sería la siguiente, considerando las frecuencias genotípicas obtenidas en esta tesis:

$$C/T = \frac{2 \times 36 + 79 + 36}{500} = \frac{187}{500} = 0,374$$

$$C/C = 79 + 2 \times 49 + 38 / 500 = 215/500 = 0,43$$

$$T/C = 36 + 38 + 2 \times 12 / 500 = 98/500 = 0,196$$

$$T/T = 0 / 500 = 0,00$$

Este análisis permite verificar que el D' estimado por Carr *et al* explica las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en la población estudiada en el presente trabajo. Por ende, los SNPs rs2279345 y rs8192719 se encontrarían en desequilibrio de ligamiento de acuerdo con su medida ($D' = 0,92$)

4.1.5.3 Para los rs3745274 y rs2279345 se tiene un $D' = 0,86$

$D = D' \times p1q2$, donde $p1$ es la frecuencia (f) del alelo G del rs3745274 (0,76) y $q2$ es la f del alelo T del rs2279345 (0,2), y tiene un valor (0,152) menor a $p2q1$ (0,192)

$$D = 0,86 \times 0,152$$

$$D = 0,13072$$

Con este valor para D se aplica la fórmula para estimar la frecuencia del haplotipo GC (X11) para los rs3745274 y rs2279345.

$$f \text{ haplotipo GC} = D + p1q1$$

donde $p1q1$ es igual a la f del alelo G de rs3745274 multiplicado por la f del alelo C del rs8192719 (0,608)

$$f \text{ haplotipo GC} = 0,13072 + 0,608$$

$$f \text{ haplotipo GC} = 0,739$$

Utilizando la f del haplotipo GC y las frecuencias indicadas en la tabla 7 podemos estimar las frecuencias de los cuatro haplotipos.

$$f \text{ haplotipo GC} = 2 \times 87 + 59 + 36 + X / 480$$

$$0,739 \times 480 = 355$$

X = 86

Por ende, los 15 individuos constituidos por los genotipos GT (rs3745274) y CT (rs2279345), no explican la f esperada para estos haplotipos

Este análisis permite verificar que el D' estimado en un estudio anterior hecho en Chile, no explica las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en la población estudiada en el presente trabajo. Por ende, los SNPs rs3745274 y rs2279345 no se encontrarían en desequilibrio de ligamiento de acuerdo a su medida ($D' = 0,86$)

4.2 Resultados del estudio para determinar frecuencia de *UGT1A1*28* en población general chilena.

A partir de las muestras disponibles en el “Banco de colección de ADN para estudios farmacogenómicos en población general chilena” del Laboratorio de Carcinogénesis, Química y Farmacogenética (CQF), se seleccionaron 359 muestras al azar.

De las muestras seleccionadas 18 fueron excluidas del análisis: 13 de ellas debido a que no se logró amplificación o la señal de fluorescencia máxima emitida era muy baja (menor a 2000 dR); y las otras 5 debido a que no se logró amplificación por PCR en tiempo real con ambas sondas. En ambos casos no había disponibilidad de muestra de DNA genómico suficiente para repetir el análisis.

A partir de las 341 muestras utilizadas para la genotipificación por sondas *TaqMan*®, se seleccionaron aleatoriamente 140 muestras para genotipificación por PCR-SSCP, de las cuales 5 fueron excluidas debido a que no se logró obtener producto de PCR visible en el gel post-tinción. La reducción del tamaño muestral para la genotipificación por esta técnica se debió principalmente a la limitación del tiempo y dificultad del trabajo práctico.

4.2.1 Genotipificación por discriminación alélica con sondas *TaqMan*®

De las 341 muestras analizadas se determinó la frecuencia genotípica y alélica del SNP rs6742078, disponibles en la **Tabla 12**. Se determinaron también las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs887829, disponibles en la **Tabla 13**. Esto permite iniciar el análisis de desequilibrio de ligamiento entre ambas, es decir, la no segregación de forma independiente dada la tasa de recombinación menor al 50%.

Tabla 12. Frecuencias genotípica y alélica para el *Single Nucleotide Polymorphism* rs6742078 en población chilena..

Frecuencia	Genotípica			Alélica	
	G/G	G/T	T/T	G	T
N	169	140	32	478	204
%	49,12	41,93	8,95	70,09	29,91
Total	341 (100%)			682	

N = número de muestras analizadas, G/G = genotipo homocigoto silvestre, G/T = genotipo heterocigoto, T/T = genotipo mutado.

Tabla 13. Frecuencias genotípica y alélica para el *Single Nucleotide Polymorphism* rs887829 en población chilena.

Frecuencia	Genotípica			Alélica	
	C/C	C/T	T/T	C	T
N	169	140	32	478	204
%	49,12	41,93	8,95	70,09	29,91
Total	341 (100%)			682	

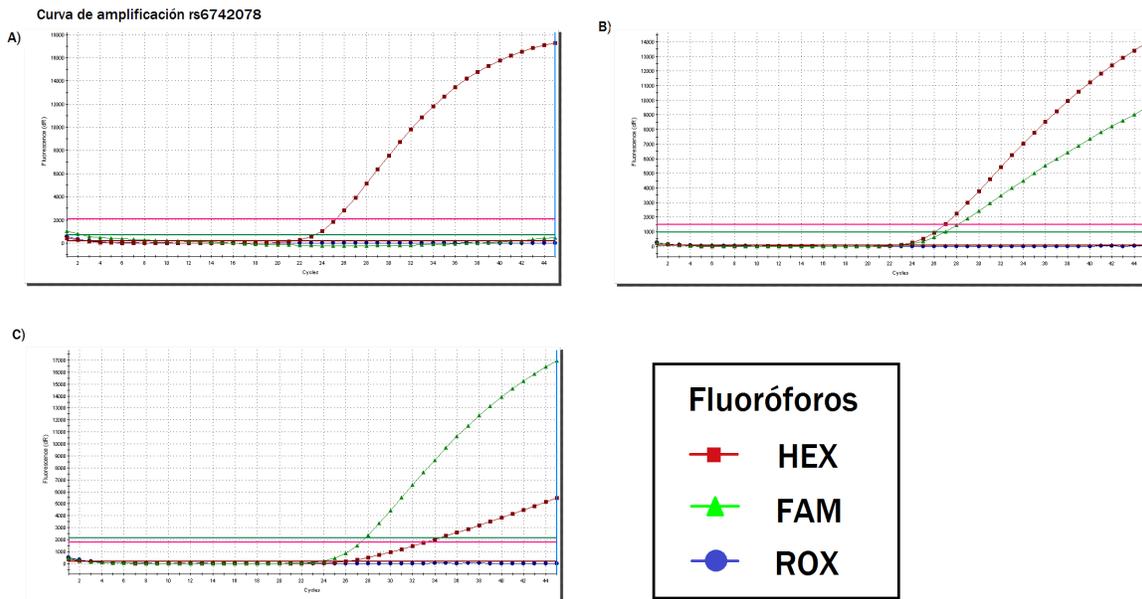
N = número de muestras analizadas, C/C = genotipo homocigoto silvestre, G/T = genotipo heterocigoto, T/T = genotipo mutado.

A continuación, se presentan imágenes representativas de la obtención de resultados de las curvas de amplificación por PCR en tiempo real para cada polimorfismo. En la **Figura 6** se observa una imagen representativa para cada uno de los distintos genotipos del sitio polimórfico rs6742078. En la **Figura 7** se observa una imagen representativa de cada uno de los genotipos del sitio polimórfico rs887829.

La presencia del alelo silvestre se determina con la señal del fluoróforo HEX (equivalente a VIC descrito en la sección de material y métodos) mientras que la presencia del alelo mutado se determina con la señal del fluoróforo FAM. Además, se utiliza un tercer fluoróforo (ROX) como control de fluorescencia que al no estar presente en las sondas debe

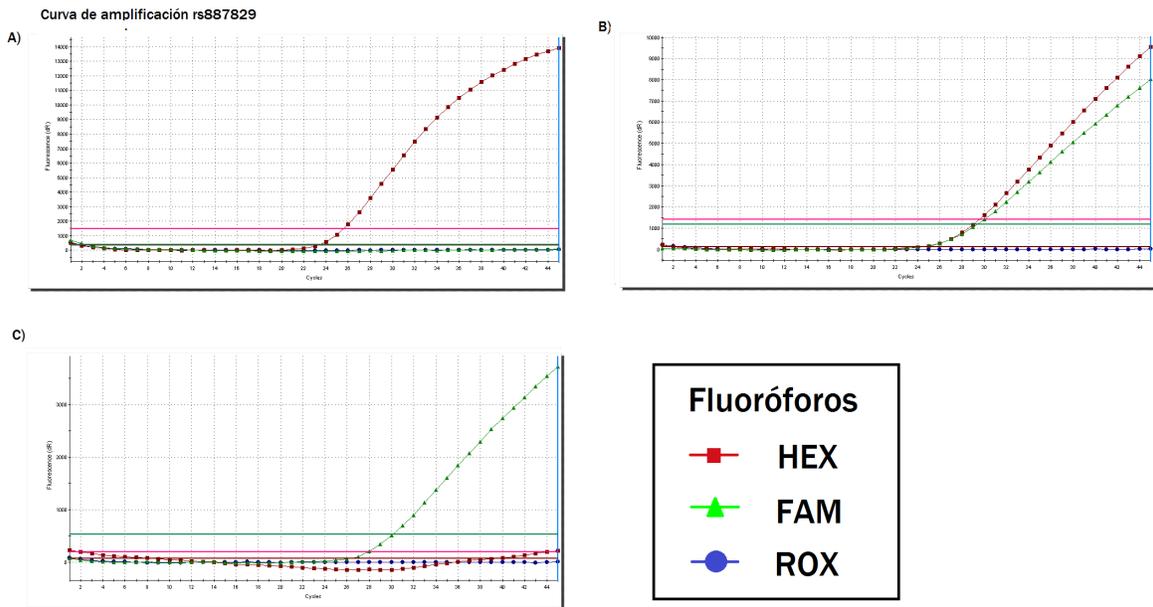
mantenerse en la línea basal. Si existe señal de amplificación con ROX los resultados de la muestra no se consideran para el análisis.

Figura 6. Genotipificación por discriminación alélica con sondas *TaqMan*® para rs6742078.



A) Genotipo homocigoto silvestre, donde la muestra de DNA genómico presenta señal sólo para el fluoróforo HEX, por lo tanto sólo presenta el alelo silvestre (G). B) Genotipo heterocigoto, la muestra presenta señal para ambos fluoróforos, HEX y FAM, cuya diferencia en el ciclo umbral (Ct) es inferior a 2. C) Genotipo homocigoto mutado, la muestra presenta señal sólo para el fluoróforo FAM, se observa una elevación inespecífica de la señal del fluoróforo HEX. La señal del fluoróforo ROX (control) se mantiene en la línea basal para cada caso.

Figura 7. Genotipificación por discriminación alélica con sondas *TaqMan*® para rs887829.



A) Genotipo homocigoto silvestre, donde la muestra de DNA genómico presenta señal sólo para el fluoróforo HEX, por lo tanto sólo presenta el alelo silvestre (C). B) Genotipo heterocigoto, la muestra presenta señal para ambos fluoróforos, HEX y FAM, cuya diferencia en el ciclo umbral (Ct) es inferior a 2. C) Genotipo homocigoto mutado, la muestra presenta señal sólo para el fluoróforo FAM. Las diferencias en la fluorescencia máxima se deben a la cantidad de DNA genómico en la muestra. La señal para el fluoróforo ROX se mantiene en la línea basal para cada caso.

Se encontró que tanto las frecuencias genotípicas como alélicas coincidieron para ambos polimorfismos, por lo que se realizó un análisis comparativo directo de cada muestra analizada. Los genotipos de cada una de las muestras fueron concordantes entre ambos polimorfismos en un 100% del total analizado.

Sobre el trabajo realizado, la ventaja que ofrece esta metodología es la especificidad de las sondas con respecto a su región blanco y su interpretación sencilla, mediante la aparición y visualización de señal de distintos fluoróforos para determinar el genotipo a partir de una muestra de ADN genómico. Además, se puede controlar la fluorescencia inespecífica si se trabaja con un tercer fluoróforo (ROX) que al no estar presente en la sonda debe mantener

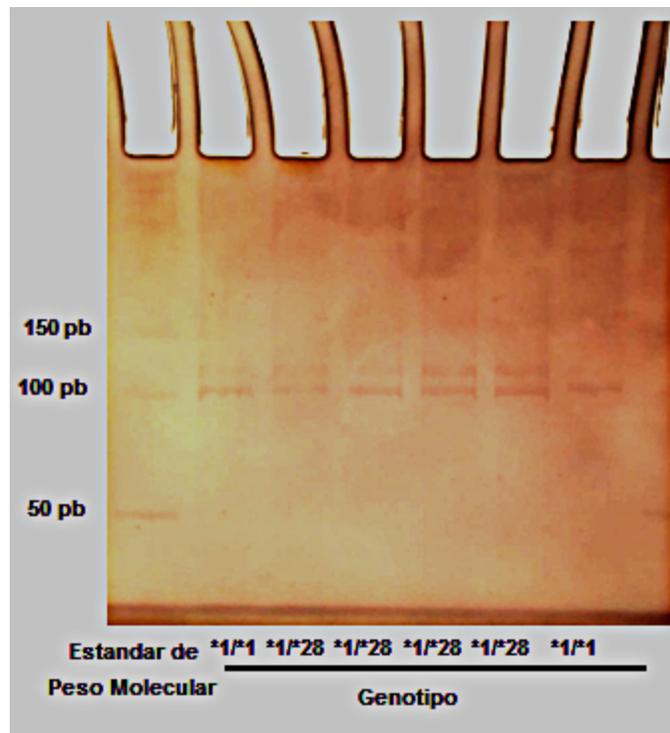
su señal fluorescencia basal, permitiendo excluir del análisis las muestras que presenten reacción con el fluoróforo control.

4.2.2 Genotipificación por *Polymerase chain reaction-single-strand conformation Polymorphism (PCR-SSCP)*.

Se determinó la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo *UGT1A1*28* en 135 muestras como se detalla previamente. Los resultados de las frecuencias se detallan en la **Tabla 14**. Se evaluó la especificidad del ADN amplificado analizando el producto de PCR en un gel de agarosa al 1,2% observando una banda de 100 pb o 102 pb.

Se presenta a continuación una imagen representativa de la genotipificación por PCR-SSCP con tinción de Nitrato de Plata (**Figura 8**).

Figura 8. Resultado representativo de la genotipificación por PCR-SSCP con tinción con nitrato de plata.



Se observa un patrón de bandeo correspondiente con muestras de genotipo silvestre (banda única de 100 pb) y genotipo heterocigoto (dos bandas de 100 pb y 102 pb correspondientes a alelo silvestre y mutado respectivamente).

Los aspectos experimentales de esta metodología de genotipificación son difíciles de estandarizar, ya que son dependientes de muchas condiciones diferentes, tales como la densidad del gel de poliacrilamida, las condiciones y tiempo de la corrida electroforética, la denaturación del producto de PCR de la región promotora del gen *UGT1A1*, la cantidad de producto de PCR denaturado por pocillo, la preparación de las distintas soluciones utilizadas para la tinción, los tiempos de aplicación de cada solución y la experiencia del operador de la técnica. Es por estas dificultades que se plantea un método de detección rápido y alternativo del genotipo distinto de la secuenciación.

Tabla 14. Frecuencias genotípica y alélica para el polimorfismo *UGT1A1**28 en población chilena.

Frecuencia	Genotípica			Alélica	
	*1/*1	*1/*28	*28/*28	*1	*28
N	67	55	13	189	81
%	49	42	9	70	30
Total	135 (100%)			270	

N = número de muestras analizadas, *1/*1 = genotipo homocigoto silvestre con ambos alelos con 6 repeticiones de TA en la región promotora (TA₆), *28/*28 = genotipo mutado con ambos alelos con 7 repeticiones de TA en la región promotora (TA₇), *1/*28 = genotipo heterocigoto con un alelo TA₆ y otro TA₇.

4.2.3 Equilibrio de *Hardy-Weinberg*

Se determinaron si los polimorfismos analizados cumplían el equilibrio de *Hardy-Weinberg* en la población estudiada utilizando la fórmula $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ descrita en la metodología, donde “p” representa el alelo más frecuente y “q” el alelo menos frecuente. Para esto se procedió a calcular las frecuencias alélicas por conteo directo de cada alelo para los sitios polimórficos rs6742078 (**Tabla 12**), rs887829 (**Tabla 13**) y *UGT1A1*28* (**Tabla 14**).

Se reemplazaron las frecuencias alélicas calculadas para rs6742078 ($p = 0,7009$ y $q = 0,2991$), rs887829 ($p = 0,7009$ y $q = 0,2991$) y *UGT1A1*28* ($p = 0,7$ y $q = 0,3$) se obtuvo un resultado igual a 1.

Se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para realizar test de chi cuadrado (χ^2) (los datos de rs6742078 y rs887829 se expresan en una tabla única debido a que las frecuencias coinciden para ambos sitios polimórficos), resultando 167,5 para los homocigotos silvestres, 142,98 para los heterocigotos y 30,52 para los homocigotos mutados como se observa en la **Tabla 15**. Además, se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para realizar test de chi cuadrado (χ^2) para *UGT1A1*28*, resultando 66,15 para los homocigotos silvestres, 56,7 para los heterocigotos y 12,5 para los homocigotos mutados como se observa en la **Tabla 16**.

Se realizó test de chi cuadrado (χ^2) para verificar que el polimorfismo cumplía el equilibrio de *Hardy-Weinberg* en la población estudiada. El valor de χ^2 con un grado de libertad y un $\alpha = 0,05$ es de 3,84; como el χ^2 calculado en la población observada para cada uno de los polimorfismos es menor al esperado se concluye que la diferencia no es estadísticamente significativa y por lo tanto se cumple el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (**Tablas 15 y 16**).

Las frecuencias obtenidas son menores que las descritas en estudios previos en población africana, mayores que en población asiática³¹ y similares a población chilena descrita por Mendez *et al*, española y población mundial (Beautel *et al*, 1998; Méndez *et al*, 2013; Barbarino *et al* 2014; Lampe *et al*, 1999). Estos resultados podrían atribuirse al porcentaje de mezcla amerindio-caucásica (%Ma-c) de 31,6% que indica que en la población analizada existe alrededor de un tercio de ascendencia amerindia.

Tabla 15. Test de chi cuadrado para las frecuencias genotípicas en la población estudiada para los *Single Nucleotide Polymorphisms* rs6742078 y rs887829.

Genotipo	Observado (o)	Esperado (e) (f. gen/total)	Desviación (o-e)	(o-e) ²	(o-e) ² /e
Homocigoto silvestre	169	167,5	1,5	2,25	0,0134
Heterocigoto	140	142,98	-2,98	8,8804	0,06211
Homocigoto mutado	32	30,52	-1,48	2,1904	0,07177
Grados de libertad: (Fenotipos – alelos) = 1.					$\chi^2 =$
					0,1473

Observado = frecuencia genotípica observada para ambos SNPs, Esperado = frecuencias genotípicas esperadas obtenidas de la frecuencia genotípica calculada por el total de muestras analizadas.

Tabla 16. Test de chi cuadrado para las frecuencias genotípicas en la población estudiada para *UGT1A1*28*.

Genotipo	Observado (o)	Esperado (e) (f. gen/total)	Desviación (o-e)	(o-e) ²	(o-e) ² /e
Homocigoto silvestre	67	66,15	0,85	0,7225	0,01092
Heterocigoto	55	56,7	-1,7	2,89	0,05097
Homocigoto mutado	13	12,5	0,5	0,25	0,02
Grados de libertad*: (Fenotipos – alelos) = 1.					$\chi^2 = 0,08189$

Observado = frecuencia genotípica observada para ambos SNPs, Esperado = frecuencias genotípicas esperadas obtenidas de la frecuencia genotípica calculada por el total de muestras analizadas. *Los grados de libertad fueron calculados asumiendo la presencia de sólo dos alelos para la región, *1 y *28. Si bien se ha descrito más alelos con distintas repeticiones de TA para este sitio polimórfico, su frecuencia es muy baja y no fueron encontrados en la población analizada.

4.2.4 Porcentaje de Mezcla amerindio-caucásica

Para determinar el % de mezcla amerindio-caucásica ($\%M_{A-C}$), que permite establecer el nivel de mestizaje de la población, se determinó a todos los voluntarios el grupo sanguíneo y luego se calculó la frecuencia alélica para el sistema ABO, mediante al equilibrio *Hardy-Weinberg* (ecuación 1-3) y ecuación de *Bernstein* (ecuación 4-9) como se describe en la metodología.

A continuación, al reemplazar en las ecuaciones 4 a 6 el número de personas con grupo A, B y O, se obtiene la frecuencia alélica para A, B y O de la población estudiada (**Tabla 16**). Finalmente, se reemplazó la frecuencia alélica en la ecuación 10, donde F. Población de estudio es igual a 0,7612 para el grupo sanguíneo O (valor r' de la ecuación 9).

Se encontró que en la población estudiada hay aproximadamente un 31,6 % de mezcla amerindio-caucásica (**Tabla 16**).

Tabla 17. Distribución de los grupos sanguíneos, frecuencia alélica para el sistema ABO y porcentaje de mezcla amerindio caucásico ($\%M_{A-C}$).

Grupo Sanguíneo	AB	A	B	O	Total
Chilenos	6	101	38	196	341
Frecuencias alélicas ABO	A		B		O
Chilenos	0,1719		0,0669		0,7612
Espanoles*	0,2864		0,0670		0,6465
$\%M_{A-C}$	16,05		0,011		31,6
Total	341		682		

*Datos obtenidos de Acuña *et al*, 2000²⁶

4.2.5 Desequilibrio de Ligamiento

Se calculó el desequilibrio de ligamiento entre rs6742078 y UGT1A1*28 (Tabla 16), entre rs887829 y UGT1A1*28 y entre rs6742078 y rs887829 utilizando la metodología descrita en la sección Metodología. Primero se calculó el valor D para cada par de alelos (Tabla 17).

Tabla 18. Matriz de co-ocurrencia para el cálculo del “Valor D”.

			UGT1A1*28	
			*1	*28
			189 (0,7)	81 (0,3)
rs6742078	G	189 (0,7)	1 (r ₁)	0 (t ₁)
	T	81 (0,3)	0 (s ₁)	1 (u ₁)
rs6742078	C	189 (0,7)	1 (r ₂)	0 (t ₂)
	T	81 (0,3)	0 (s ₂)	1 (u ₂)
Valor D ₁ (entre alelos <i>f</i> y UGT1A1*28) = (r ₁ u ₁ – s ₁ t ₁) = 1				
Valor D ₂ (entre alelos rs887829 y UGT1A1*28) = (r ₂ u ₂ – s ₂ t ₂) = 1				
			rs887829	
			C	T
			478 (0,7009)	204 (0,2991)
rs6742078	G	478 (0,7009)	1 (r ₁)	0 (t ₁)
	T	204 (0,2991)	0 (s ₁)	1 (u)
Valor D (entre rs6742078 y rs887829) = (r ₁ u ₁ – s ₁ t ₁) = 1				

La co-ocurrencia entre los genotipos de un polimorfismo y otro se expresan en valores de 0 a 1. La co-ocurrencia se define como la frecuencia o porcentaje de aparición conjunta entre dos alelos de distintos genes.

Se calculó el r^2 para determinar desequilibrio de ligamiento entre cada uno de los polimorfismos estudiados utilizando la metodología descrita por Hill *et al.*

$r^2 = D^2 / (p_A q_B * q_A p_B)$. Reemplazando los valores para calcular el desequilibrio de ligamiento entre UGT1A1*28 y rs887829, $r^2 = 1^2 / (1 * 1) = 1$. Obteniéndose un $r^2 = 1$, para calcular el desequilibrio de ligamiento entre UGT1A1*28, $r^2 = 1^2 / (1 * 1)$, obteniéndose un $r^2 = 1$. Adicionalmente se calculó el desequilibrio de ligamiento entre rs6742078 y 887829, r^2

$= 1^2 / (1 \cdot 1) = 1$, obteniéndose un $r^2 = 1$. Coincidente con el valor D obtenido en la **Tabla 17**.

En el caso del gen *UGT1A1*, a mayor cantidad de repeticiones TA en la caja TATA, de la región promotora del gen, menor es la funcionalidad (actividad transcripcional). De esa forma, los alelos con 8 ó 9 repeticiones de TA producen una tasa de iniciación de transcripción menor a la del alelo silvestre con 6 repeticiones de TA y pueden generar reacciones adversas a medicamentos o fracasos terapéuticos, por lo tanto, se justifica su determinación para fines farmacogenéticos. En esta parte del estudio no se encontró presencia de los alelos TA₅, TA₈ o TA₉, lo que puede deberse a su baja frecuencia. Sin embargo, del total de muestras analizadas, no todas fueron genotipificadas por PCR-SSCP, por lo que no se podría asegurar que no se encuentren estos alelos en población chilena.

No se han encontrado estudios que describan simultáneamente la frecuencia de estos polimorfismos en población chilena, pero un estudio chileno reciente realizado por Méndez *et al* utilizó rs6742078 para la determinación indirecta de *UGT1A1*28*. Tampoco se encontraron estudios que determinen o caractericen el grado de correlación o el desequilibrio de ligamiento entre la genotipificación de *UGT1A1*28* y la genotipificación de rs6742078 y rs887829. Por lo tanto, este es el primer trabajo que evalúa el desequilibrio de ligamiento entre rs6742078, rs887829 y *UGT1A1*28*, estableciendo a través de esto una correlación entre la metodología de detección del alelo *UGT1A1*28* directa y la detección indirecta.

4.3 Resultados del estudio en pacientes que viven con virus de inmunodeficiencia humana.

4.3.1 Reclutamiento de pacientes

Este trabajo de tesis enroló un total de 70 pacientes que viven con VIH, reclutados en el policlínico del Infectología del HSJD. A estos pacientes se les comunicó e informó las características del estudio para luego ellos confirmar su participación voluntaria firmando el documento consentimiento informado y completando la información en la ficha de ingreso al estudio (**Anexo 1**). Luego de este proceso, se les tomó una muestra de sangre. Las características generales de la muestra se detallan en la **Tabla 19**. Con edad promedio de $35,9 \pm 10,4$ años, mediana de 34 años y un grupo etario de 30 a 39 años (37,1%) como el más prevalente. Cincuenta y seis pacientes de sexo masculino y 14 pacientes de sexo femenino (80% y 20% respectivamente), todos de nacionalidad chilena.

Tabla 19. Características generales de la población en estudio.

Edad	años
Media + DE	35,9 ± 10,4
Mediana	34
Grupo etario (años)	n (%)
20-29	23 (32,86)
30-39	26 (37,14)
40-49	15 (21,43)
≥ 50	6 (8,57)
Sexo	n (%)
Femenino	14 (20)
Masculino	56 (80)
TAR	n (%)
<i>Pacientes con ATV</i>	39
+ abacavir/lamivudina	24 (61,54)
+ tenofovir/emtricitabina	13 (33,33)
+ zidovudina/lamivudina	2 (5,13)
<i>Pacientes con EFV</i>	39
+ abacavir/lamivudina	21 (53,85)
+ tenofovir/emtricitabina	14 (35,89)
+ zidovudina/lamivudina	4 (10,26)

DE: Desviación estándar, TAR: Terapia Antirretroviral, ATV: atazanavir, EFV: efavirenz.

La población de estudio registró 3 esquemas farmacológicos que acompañaron a su terapia con EFV o ATV. En ambos grupos, se puede observar una mayor presencia del esquema de abacavir/lamivudina (53,85 y 61,54% respectivamente).

Del total de pacientes enrolados, 31 de ellos utilizó EFV, 31 ATZ y sólo 8 recibieron EFV y ATZ en diferentes regímenes separados temporalmente. De este último grupo, cada uno de ellos se considera como paciente individual en los análisis estadísticos (44,28%; 44,28% y 11,43%).

4.3.2 Recopilación de Reacciones adversas

Se registraron 100 RAMs correspondientes a 12 eventos clínicos diferentes en base a lo obtenido en las fichas clínicas de los 70 pacientes estudiados. Las reacciones adversas de mayor incidencia fueron la hiperbilirrubinemia, observada en 28 pacientes, correspondientes al 28% de las RAM, luego, las reacciones adversas gastrointestinales presentadas en 19 pacientes (19%) y las reacciones adversas a nivel del SNC agrupadas, observadas en 15 pacientes (15%). En la **Tabla 20** se observa el número de RAMs registradas y el porcentaje de estas en relación al total de reacciones adversas (100), lo cual mantiene la tendencia observada en otro estudio que fue realizado en el mismo hospital en el año 2011 por Bernal *et al* (19,7%, 21,1% y 13,2%).

Tabla 20. Reacciones adversas a medicamentos registrados (RAMs) en la muestra de pacientes.

RAM	%	Pacientes tratados con EFV	Pacientes tratados con ATV
Hiperbilirrubinemia ^a	28	3	25
Malestar gastrointestinal	19	7	12
Rash cutáneo	10	7	3
Mareo	13	12	1
Pesadillas	12	11	1
Insomnio	5	4	1
Cefalea	6	3	3
Fiebre	2	1	1
Ansiedad	1	1	0
Lipodistrofia	1	1	0

Dislipidemia	1	1	0
Intento suicida	2	1	1
SNC^b	15	13	2

EFV: efavirenz; ATV: atazanavir; SNC: Sistema Nervioso Central.

^a Bilirrubina total >1,2 mg/dL

^b Pesadilla, insomnio, ansiedad e intentos suicidas se agruparon como RAM a nivel de SNC.

Estas RAM fueron validadas por el QF a cargo del Programa Ministerial de VIH en el HSJD mediante el Algoritmo de Naranja. Este algoritmo, mediante la aplicación de preguntas, asigna un puntaje desde 0 a 2 para definir si el evento adverso detectado es efectivamente una reacción adversa, es decir, si ocurre a causa del medicamento. Por lo tanto, se utiliza el algoritmo mencionado para evaluar causalidad de la RAM. La RAM es definitiva, con un puntaje > 9; probable, si el puntaje se encuentra entre 5-8; posible, cuando está entre 1-4; o dudoso o improbable si la puntuación es 0.

Tomando como ejemplo el caso del último paciente reclutado del estudio, se obtuvo un puntaje de 7, es decir, se considera una RAM probable. Este comportamiento sigue parte importante de los pacientes del estudio quienes presentaron en su mayoría RAMs “probable” y “posible”. Este comportamiento es similar al observado en un estudio previo en el mismo centro, donde un 85% de las RAMs fueron “probable” y el 15% “posibles” en pacientes que viven con VIH según Bernal *et al* (2011).

En el caso de la hiperbilirrubinemia, la Guía Clínica de VIH establece graduación según las veces que aumenta este parámetro según el límite máximo normal permitiendo la clasificación en Grado 1 (1,1 a 1,5 veces), Grado 2 (1,6 a 2,5 veces), Grado 3 (2,6 a 5 veces) y Grado 4 (aumento de más de 5 veces).

Aunque hubo RAMs en ambos grupos de pacientes (tratados con EFV o ATV), la presencia de RAMs en el SNC fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que recibió EFV, mientras que la hiperbilirrubinemia (bilirrubina total > 1,2 mg/dL) fue más frecuente en pacientes que recibieron ATV, considerando que la distribución del resto de la TAR que acompañaba a EFV y ATV tuvo un comportamiento similar. Por lo tanto, se pudo determinar en este estudio es que un grupo de pacientes presentó RAMs específicas según su terapia.

4.3.3 Distribución de genotipos en pacientes portadores de VIH en TAR

En la **Figura 9**, se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación por PCR en tiempo real obtenida de muestras analizadas en el estudio. En la **Tabla 21**, se muestra la frecuencia genotípica y alélica de los cuatro polimorfismos en estudio. En el caso de 3 pacientes, no pudo establecerse el genotipo para CYP3A4*1B por problemas relacionados a la estabilidad de la sonda *TaqMan*® utilizada.

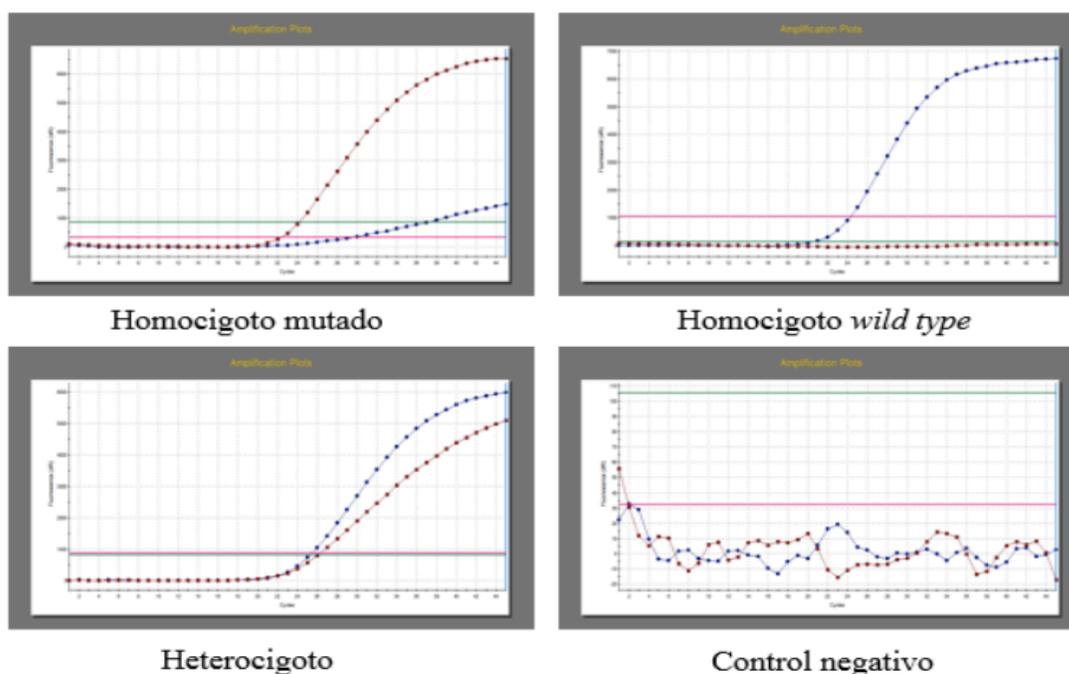


Figura 9. Curvas de amplificación representativas obtenidas por PCR tiempo real para análisis genotípico con sondas *TaqMan*®.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes de la muestra.

Variante genética	Frecuencia genotípica (n, %)			Frecuencia alélica	
<i>CYP2B6*6</i> c.516G>T rs3745274 n = 70	G/G 29	G/T 31	T/T 10	fG 0,64	fT 0,36
<i>UGT1A1*80</i> rs887829 n = 70	TA ₆ /TA ₆ 32	TA ₆ /TA ₇ 26	TA ₇ /TA ₇ 12	fTA ₆ 0,64	fTA ₇ 0,36
<i>CYP3A4*1B</i> g.99784473C<T rs2740574 n = 67	C/C 58	C/T 9	T/T 0	fC 0,94	fT 0,06
<i>CYP3A5*3</i> c.219-237T<C rs776746 n = 70	T/T 2	T/C 11	C/C 57	fT 0,11	fC 0,89

La **Tabla 21** muestra la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos de los pacientes incluidos en este estudio. El alelo de menor frecuencia obtenido fue relativamente alto (0,36 para *CYP2B6* c.516G>T (alelo T) y *UGT1A1*28* (repetición número 7 en caja TATA), lo que entregó una buena potencia estadística para asociación.

En la **Tabla 22** se muestra una comparación entre las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio y las frecuencias obtenidas en la población de origen europeo y de origen americano.

Tabla 22. Referencia de frecuencias obtenidas para los *Single Nucleotide Polymorphisms* estudiados, con distintas poblaciones.

	Frecuencia alélica en este estudio	Población Chilena	Población Europea*	Colombia*	México*	Perú*	Puerto Rico*
CYP3A4*1B (rs2740574) <i>frecuencia del alelo C</i>	0,06	0,06**	0,03	0,10	0,07	0,04	0,19
CYP3A5*3 (rs 776746) <i>frecuencia del alelo C</i>	0,89	0,76**	0,94	0,81	0,77	0,88	0,74
UGT1A1 (rs 8175347) <i>frecuencia del alelo 7</i> Nota	0,36	0,31***	0,30	0,34	0,37	0,45	0,36
CYP2B6*6 (rs3745274) <i>frecuencia del alelo T</i>	0,36	0,24****	0,24	0,37	0,31	0,46	0,35

* Frecuencias alélicas por poblaciones y subpoblaciones en el proyecto 1000 genomas.

** Roco et al, 2012.

*** Burgos, 2017.

**** Echeverría, 2017.

Nota: UGT1A1* 28 (rs 8175347) fue determinado indirectamente mediante la variante UGT1A1*80 (rs 887829) por sondas *TaqMan*®

Se realizó un análisis de asociación mediante una regresión logística univariada, entre las variantes genéticas, en tres modelos de herencia, esto es, codominante, recesivo, dominante y cada RAM. El modelo dominante refiere a la necesidad de la presencia de solo 1 alelo de riesgo para manifestar la reacción adversa, es decir, agrupa al genotipo homocigoto para el alelo de riesgo y al genotipo heterocigoto. El modelo recesivo refiere la presencia de 2 alelos de riesgo para manifestar la RAM, es decir, solo incluye al genotipo homocigoto para el alelo de riesgo. En el modelo codominante, cada genotipo tiene su propio riesgo en cuanto la manifestación de la RAM. Se seleccionaron todos los análisis que presentaron un valor de significancia < 0,05 y se consideran los análisis con valor < 0,2 para análisis multivariados.

4.3.4 Análisis regresión logística respecto a efavirenz.

Objetivo específico asociado

*Identificar la relación entre las variantes genéticas CYP2B6*6, CYP3A4*1B y CYP3A5*3 y efectos adversos asociados a terapia con efavirenz.*

De un total de 70 pacientes reclutados en nuestro estudio, 39 utilizaban en su esquema terapéutico EFV. Se realizaron los análisis de correlación entre las distintas reacciones adversas reportadas y los distintos modelos de herencia (codominante, recesivo y dominante). En este grupo de pacientes, se observó un *p-value* estadísticamente significativo al evaluar la RAM pesadillas en los modelos codominante (OR: 13; *p-value*: 0,026) y recesivo (OR: 7,43; *p-value*: 0,037) (**Tabla 23**). El modelo dominante no se asocia de forma significativa con la RAM, con un *p-value* de 0,117 y OR 3,9.

Sobre las RAMs a nivel de SNC asociadas a la terapia con EFV, las pesadillas tiene un aparición documentada controversial en estudios comparables, yendo desde el 10 al 74%. Esta es una RAM cuyo manejo farmacológico presenta mayor complejidad, siendo la único de las RAMs que, eventualmente, no puede tratarse con medicamentos. Dos modelos arrojaron *p-value* estadísticamente significativo y se observa que, en el análisis de modelo codominante, el genotipo homocigoto para el alelo de riesgo (T/T) presenta un OR:13 y *p-value* 0,026, mientras que el otro *p-value* estadísticamente significativo se presenta en el modelo recesivo con un OR: 7,43 y *p-value*: 0,037. En el modelo dominante no se observa significancia estadística, pero se puede evaluar ese dato en análisis multivariado dado su *p-value*<0.2.

Tabla 23. Regresión logística univariada entre *CYP2B6* c.518G>T (rs3745274) y pesadillas en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Codominante	G/G	1	Ref	
	G/T	2,5	0,321	0,409 – 15,292
	T/T	13,0	0,026*	1,360 – 124,297
Dominante	G/G	1	Ref	
	G/T + T/T	3,9	0,117	0,711 – 21,406
Recesivo	G/G + G/T	1	Ref	
	T/T	7,43	0,037*	1,120 – 49,244

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Al agrupar las reacciones adversas asociadas al SNC, toxicidad principal para este fármaco definido en la Guía clínica, tales como pesadillas, insomnio, ansiedad e intentos suicidas y hacer la regresión logística univariada, se observaron resultados estadísticamente significativos en todos los modelos evaluados (**Tabla 24**).

Tabla 24. Regresión logística univariada entre *CYP2B6* c.518G>T (rs3745274) y reacciones adversas a nivel de Sistema Nervioso Central agrupadas (pesadillas, insomnio, ansiedad e intentos suicidas) en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Codominante	G/G	1	Ref	-
	G/T	3,25	0,195	0,547 – 19,316
	T/T	32,50	0,009*	2,384 – 444,145
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	5,5	0,048*	1,013 – 29,850
Recesivo	G/G + G/T	1	Ref	-
	T/T	15,63	0,018*	1,582 – 154,279

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Si bien las RAMs insomnio, ansiedad e intentos suicidas no arrojan valores estadísticamente significativas por sí solas en la regresión logística univariada, sí lo hacen

al ser agrupadas junto a la RAM pesadilla, demostrando significancia estadística en los 3 modelos de herencia analizados. El modelo codominante en su genotipo T/T y el modelo recesivo presentan valores estadísticamente significativos (OR: 32,50 y *p-value*: 0,009; OR: 15,63 y *p-value*: 0,018, respectivamente). El modelo dominante igualmente presenta un *p-value* estadísticamente significativo de 0,048; en este estudio fueron incluidos pacientes que, dado su genotipo y presencia de estas RAMs, generó una pequeña modificación estadística que movió a este modelo de un *p-value* no significativo en primer avance (OR: 5,08 y *p-value*: 0,061) a los resultados observados en la **Tabla 23**.

La regresión logística univariada entre CYP2B6 c.518G>T (rs3745274) y las otras RAMs presentes en los pacientes no generó resultados estadísticamente significativos. En la **Tabla 25, 26 y 27** se puede observar que, si bien se pueden analizar los 3 modelos, no hay resultados significativos para hiperbilirrubinemia, malestar gastrointestinal y mareos respectivamente.

Tabla 25. Regresión logística univariada de CYP2B6*6 e hiperbilirrubinemia en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	<i>p-value</i>	95% IC
Codominante	G/G	1	Ref	-
	G/T	0,82	0,894	0,047 – 14,389
	T/T	2,80	0,495	0,146 – 53,706
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	1,27	0,850	0,105 – 15,385
Recesivo	G/G + G/T	1	Ref	-
	T/T	3,1	0,390	0,235 – 40,895

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Tabla 26. Regresión logística univariada de *CYP2B6**6 y malestar gastrointestinal en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Codominante	G/G	1	Ref	-
	G/T	4,00	0,240	0,396 – 40,424
	T/T	7,00	0,149	0,497 – 98,601
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	4,67	0,176	0,502 – 43,366
Recesivo	G/G + G/T	1	Ref	-
	T/T	2,8	0,300	0,400 – 19,600

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Tabla 27. Regresión logística univariada de *CYP2B6**6 y mareos en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Codominante	G/G	1	Ref	-
	G/T	2,00	0,396	0,407 – 0,910
	T/T	4,00	0,183	0,520 – 30,762
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	2,40	0,256	0,530 – 10,876
Recesivo	G/G + G/T	1	Ref	-
	T/T	2,67	0,279	0,452 – 15,722

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

En las **Tablas 28, 29 y 30** se observa que sólo se pudo analizar la regresión logística univariada en el modelo dominante pero no arroja resultados significativos para rash, insomnio y dolor de cabeza respectivamente. No se pueden evaluar los otros modelos al no ser posible completar con casos y controles la tabla de contingencia. Esto no permite obtener valores de intervalo de confianza ni OR.

Tabla 28. Regresión logística univariada de CYP2B6*6 y rash en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	1,71	0,556	0,287 – 10,195

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Tabla 29. Regresión logística univariada de CYP2B6*6 e insomnio en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	0,59	0,620	0,074 – 4,713

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Tabla 30. Regresión logística univariada de CYP2B6*6 y dolor de cabeza en modelo dominante en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Dominante	G/G	1	Ref	-
	G/T + T/T	1,27	0,850	0,105 – 15,385

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

En el caso de las RAMs fiebre, ansiedad, lipodistrofia, dislipidemia e intentos suicidas no es posible realizar los análisis de los 3 modelos de herencia, al no ser posible completar con casos y controles la tabla de contingencia. Esto no permite obtener valores de intervalo de confianza ni OR.

Para la regresión logística univariada que involucra a CYP3A5*3 y CYP3A4*1B , se obtuvo el siguiente resultado:

La variante CYP3A5*3, en el modelo recesivo que la asocia con hiperbilirrubinemia, mostró un OR: 0,18 y *p-value* de 0,212 cercano al punto de corte para incluirla en un modelo multivariado. Este valor podría cambiar si el número de pacientes reclutados aumenta, por lo que se considera oportuno destacar este resultado.

Sobre su asociación con malestar gastrointestinal, el modelo recesivo entrega la información de la Tabla 31.

Tabla 31. Regresión logística univariada de modelo de CYP35A*3 y dolor gastrointestinal en modelo recesivo en pacientes tratados con efavirenz.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	<i>p-value</i>	95% IC
Recesivo	AA + AG	1	Ref	-
	GG	0,6	0,7	0,055 – 7,035

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

En CYP3A4*1B solo se puede analizar como modelo codominante, ya que no hay pacientes homocigotos para el alelo de riesgo. Esto no arroja resultados estadísticamente significativos y, al no tener a este grupo determinado de pacientes, el análisis no puede ser contemplado completamente.

Respecto al análisis multivariado, se inicia con el modelo codominante y la RAM pesadillas, que en la regresión logística univariada tienen una asociación estadísticamente significativa. Se observó que al incluir todas las variables, el mejor modelo según valor AIC, es aquel donde la probabilidad de desarrollar pesadillas en modelo codominante también considera otras RAM tales como ansiedad e intentos suicidas.

La frecuencia genotípica que se observó en este estudio para CYP2B6 c.516G>T (rs3745274) (G/G: 41,43%; G/T: 44,29%; T/T: 14,28%) fue similar a la que se observó en un estudio previo llevado a cabo en población chilena en tratamiento con EFV (G/G: 43%; G/T: 42%; T/T: 15%) (Carr *et al.*, 2010) donde la frecuencia del alelo T (0,35) fue similar a la de nuestro estudio (0,36) y de otros países latinoamericanos como Colombia (0,37), México (0,31) y Puerto Rico (0,35) y superior a la descrita para población europea (0,24; Proyecto 1000 Genomas).

4.3.5 Análisis regresión logística respecto a atazanavir

Objetivo específico asociado

Identificar la relación entre los polimorfismos genéticos en UGT1A1 y los niveles de bilirrubina no conjugada en pacientes en terapia con atazanavir.

De un total de 70 pacientes reclutados en el estudio, 39 utilizaban en su esquema terapéutico ATV. Se realizaron los análisis de correlación entre las distintas reacciones adversas reportadas (hiperbilirrubinemia, gastrointestinal, rash, cefalea y alteración a nivel del SNC) y los distintos modelos de herencia (codominante, recesivo y dominante). A nivel clínico se considera un valor 1,2mg/dL como punto de corte para definir hiperbilirrubinemia, pero sobre 1,9mg/dl se considera un cuadro moderado a severo según la Guía Clínica chilena de VIH.

Sobre la hiperbilirrubinemia considerando el punto de corte mencionado, esto no genera una diferencia estadísticamente significativa en ningún modelo de herencia como se puede observar en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Regresión logística univariada entre *UGT1A1**28 (TA_7) y niveles de bilirrubina con punto de corte 1,2 mg/dL en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Codominante	TA_6/TA_6	1	Ref	
	TA_6/TA_7	1,25	0,769	0,283 – 5,525
	TA_7/TA_7	5,83	0,151	0,525 – 64,822
Dominante	TA_6/TA_6	1	Ref	
	$TA_6/TA_7 + TA_7/TA_7$	1,76	0,438	0,422 – 7,333
Recesivo	$TA_6/TA_6 + TA_6/TA_7$	1	Ref	
	TA_7/TA_7	5,06	0,151	0,553 – 46,242

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Al evaluar el aumento de bilirrubina por sobre los 1,9 mg/dL, es decir, hiperbilirrubinemia moderada a severa, en este análisis se observa que el modelo dominante no tiene significancia estadística en la asociación, pero el modelo codominante sí tiene un *p-value* de 0,043 lo cual identifica una asociación estadísticamente significativa en el genotipo homocigoto para el alelo de riesgo. Al analizar el modelo recesivo, este arroja un valor *p* de 0,058 lo cual por factores centesimales lo deja fuera del punto de corte, pero se considera una tendencia a la significancia (**Tabla 33**).

Tabla 33. Regresión logística univariada entre *UGT1A1*28* (TA₇) y niveles de bilirrubina > 1,9 mg/dL (moderada y severa hiperbilirrubinemia) en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	<i>p-value</i>	95% IC
Codominante	TA ₆ /TA ₆	1	Ref	
	TA ₆ /TA ₇	1,75	0,467	0,387 – 7,915
	TA ₇ /TA ₇	12,25	0,043*	1,080 – 138,988
Dominante	TA ₆ /TA ₆	1	Ref	
	TA ₆ /TA ₇ + TA ₇ /TA ₇	2,7	0,177	0,638 – 11,457
Recesivo	TA ₆ /TA ₆ + TA ₆ /TA ₇	1	Ref	
	TA ₇ /TA ₇	8,5	0,058	0,931 – 77,597

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

En la regresión logística univariada que se muestra en la **Tabla 34** que buscaba una asociación entre el rash y el alelo de riesgo, solo se observa una tendencia estadística en el modelo recesivo (OR: 10; *p-value*: 0,077) que permite considerar este análisis en una regresión logística multivariada. No es posible analizar los modelos codominante y dominante ya que no hay casos en el genotipo homocigoto para el alelo ancestral.

Tabla 34. Regresión logística univariada entre *UGT1A1*28* (TA₇) y rash en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	<i>p-value</i>	95% IC
Recesivo	TA ₆ /TA ₆ + TA ₆ /TA ₇	1	Ref	
	TA ₇ /TA ₇	10	0,077	0,777 - 128,775

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Al considerar un modelo multivariado que analice el modelo codominante en pacientes con niveles de bilirrubina mayor a 1,9mg/dL y la presencia de rash, no hay una mejora del *p-value*, que en este caso aumenta su valor (de 0,043 a 0,047), por lo tanto, no se podrían incluir ambas en un modelo de este tipo. Ocurre la misma situación al realizar el mismo análisis considerado al modelo recesivo en este mismo grupo de pacientes sumando la RAM rash.

En las demás reacciones adversas registradas, no se observan otros valores estadísticos significativamente en el análisis de regresión logística univariada, como se observa en las siguientes tablas.

Tabla 35. Regresión logística univariada entre *UGT1A1*28* (TA₇) y molestias gastrointestinales.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	<i>p-value</i>	95% IC
Codominante	TA ₆ /TA ₆	1	Ref	
	TA ₆ /TA ₇	0,94	0,939	0,203 – 4,370
	TA ₇ /TA ₇	0,25	0,263	0,022 – 2,836
Dominante	TA ₆ /TA ₆	1	Ref	
	TA ₆ /TA ₇ + TA ₇ /TA ₇	0,7	0,636	0,160 – 3,066
Recesivo	TA ₆ /TA ₆ + TA ₆ /TA ₇	1	Ref	
	TA ₇ /TA ₇	0,26	0,234	0,028 – 2,393

OR: *odds ratio*; Ref: referencia; **p-value* < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Al igual que en el análisis univariado de rash, como muestra la **Tabla 34**, al realizar la regresión logística univariada con la RAM dolor de cabeza, no es posible realizar la evaluación de todos los modelos, no se puede analizar en modelo codominante ni recesivo por ausencia de casos (**Tabla 36**).

Tabla 36. Regresión logística univariada entre *UGT1A1*28* (TA_7) y dolor de cabeza en modelo dominante en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Dominante	TA_6/TA_6	1	Ref	
	$TA_6/TA_7+ TA_7/TA_7$	0,77	0,838	0,063 – 9,454

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

En el caso de las RAMs mareos, pesadillas, insomnio, fiebre, ansiedad, lipodistrofia, dislipidemia, intento suicida y RAMs a nivel de SNC agrupadas no es posible realizar los análisis de los 3 modelos de herencia, al no ser posible completar con casos y controles la tabla de contingencia. Esto no permite obtener valores de intervalo de confianza ni OR.

Para la regresión logística univariada que involucra a *CYP3A5*3* y *CYP3A4*1B*, se obtuvo el siguiente resultados (**Tabla 37 y 38**).

Tabla 37. Regresión logística univariada entre *CYP3A5*3* e hiperbilirrubinemia en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Recesivo	AA + AG	1	Ref	
	GG	0,71	0,638	0,172 – 2,937

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Tabla 38. Regresión logística univariada entre *CYP3A5*3* y malestar gastrointestinal en modelo recesivo en pacientes tratados con atazanavir.

Modelo de herencia	Genotipo	OR	p-value	95% IC
Recesivo	AA + AG	1	Ref	
	GG	3,44	0,155	0,627 – 18,840

OR: odds ratio; Ref: referencia; *p-value < 0,05, IC: intervalo de confianza.

Si bien no arroja resultados estadísticamente significativos, dado el p-value de la asociación de la variante con el malestar gastrointestinal, este podría incluirse en un estudio multivariado.

Respecto a las frecuencias observadas en el presente estudio en la muestra de pacientes que viven con VIH, para UGT1A1*28 fue de 0,36 lo cual es comparable a la frecuencia reportada en un estudio de población chilena que estudió la prevalencia del Síndrome de Gilbert. En ese estudio, la presencia del alelo *28 fue determinada indirectamente analizando el rs6742078 (G > T), variante localizada en el intrón 1 del gen *UGT1A1*, el cual está en desequilibrio de ligamiento con *UGT1A1*28* (Méndez *et al.*, 2013). Esta frecuencia es muy similar a la descrita para otros países de Latinoamérica (Colombia: 0,34; Perú: 0,45; México: 0,37) y en población Europea (0,30; Proyecto 1000 genomas). Sólo presenta diferencia al ser comparado con la población asiática donde la frecuencia reportada es de 0,16 (Atasilp *et al.*, 2020).

Dada las frecuencias de *CYP2B6* c.516G>T y UGT1A1*28 observadas en nuestro país y en Latinoamérica es necesario considerar que estos estudios se desarrollen en profundidad a futuro. Esto permitiría validar las recomendaciones de las guías CPIC de ATV (Gammal *et al.*, 2016) y EFV (Desta *et al.*, 2019) que podrían ser muy útiles para nuestros pacientes. Estas recomendaciones nos permitirían evitar las RAMs en pacientes con genotipos que estén asociados a una metabolización pobre del fármaco (genotipo homocigoto para *CYP2B6* c.516G>T) mediante la administración de dosis menores a las iniciales en los tratamientos actuales. Por ejemplo, iniciar tratamiento con EFV en una dosis reducida de 400 o 200 miligramos por día (Desta *et al.*, 2019) y no solo sugerir un cambio de terapia.

Las principales debilidades de este estudio son el número bajo de pacientes reclutados y algunos problemas con los registros en fichas clínicas, tanto para los motivos de cambio de terapia como para reacciones adversas.

5. CONCLUSIONES

- Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNPs rs3745274, rs2279345, y rs8192719, del gen *CYP2B6*, las cuales resultaron ser similares a las descritas previamente en la población chilena y se encuentran en los rangos descritos en otras etnias.
- Se verificó que el rs8192719 está en desequilibrio de ligamiento con los rs3745274 y rs2279345, además las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en este estudio son concordantes con los valores de D' señalados en estudios previos.
- Los polimorfismos rs6742078, rs887829 de *CYP2B6* y *UGT1A1*28* analizados en población chilena se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y sus frecuencias genotípicas y alélicas son similares a las descritas para población española y población mundial.
- Se logró demostrar que existe un desequilibrio de ligamiento total ($r^2 = 1$) en la población estudiada entre los SNPs rs6742078 y rs887829 de *CYP2B6* y con el alelo *UGT1A1*28*.
- Ambos SNP, tanto rs6742078 como rs887829 son útiles para la determinación indirecta del alelo *UGT1A1*28*, a pesar de que el segundo presenta desequilibrio de ligamiento con más variantes polimórficas de la región promotora de *UGT1A1*, se recomienda su utilización para estudios farmacogenéticos, pues las otras variantes también se relacionan con una disminución en la expresión de la enzima.
- Gracias a la segunda parte del presente trabajo se demuestra la aplicabilidad de la determinación indirecta del alelo *UGT1A1*28* por discriminación alélica con sondas *TaqMan*®.
- En el caso del estudio en pacientes que viven con VIH, mediante metodología de PCR en tiempo real, utilizando sondas *TaqMan*®, se logró determinar la presencia de polimorfismos en los genes *CYP2B6* c.516G>T (rs3745274), *CYP3A4* (rs2740574), *CYP3A5* (rs776746) y *UGT1A1* (rs887829), lo que permitió establecer las frecuencias alélica y genotípicas para sus respectivos alelos (*CYP2B6*6* c.516G>T, *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* y *UGT1A1*28*), en un grupo de 70 pacientes que viven con VIH, atendidos en el HSJD, y que han sido sometidos a tratamiento con EFV y/o ATV.
- Tras la identificación y cuantificación de las distintas RAMs presentadas por el grupo de pacientes en estudio, se logró establecer la relación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo *UGT1A1*28* (TA₇) e hiperbilirrubinemia moderada y severa en

pacientes tratados con ATV (OR: 12,25; *p-value*: 0,043) en genotipo homocigoto para TA₇ en modelo codominante.

- Se logró establecer la relación estadísticamente significativa entre la presencia de la variante *CYP2B6* c.516G>T con las RAMs pesadillas (OR: 13 y *p-value*: 0,026 para genotipo T/T en modelo de herencia codominante; OR: 7,43 y *p-value*: 0,037 en modelo recesivo) y toxicidad general a nivel del SNC (OR: 32,50 y *p-value*: 0,009 para genotipo T/T en modelo codominante ; OR: 15,63 y *p-value*: 0,018 en modelo recesivo), en pacientes tratados con EFV.

Es necesario continuar con este tipo de estudios para validar las recomendaciones de las guías CPIC y usar el criterio farmacogenético en la prescripción de EFV o ATV. Esto puede, a futuro, mejorar la adherencia a la terapia en pacientes que viven con VIH, lo cual es un punto crítico del éxito de la terapia.

Utilizar apropiadamente esta información ayudaría a “rescatar” el uso de fármacos que, si bien son muy efectivos, son considerados “inseguros” y su prescripción ha disminuido dado el tipo y frecuencia de RAMs. También permitiría que su uso tan cuestionado sea optimizado mediante un análisis farmacogenético previo, que no solo relacione la aparición de RAMs con las características del fármaco sino también con las características propias del paciente.

La estrategia de ONUSIDA es lograr que al año 2030, 95% de los pacientes conozcan su diagnóstico, 95% estén bajo TAR y 95% tengan su carga viral indetectable. Aplicar estudios farmacogenéticos prospectivos y validar las guías clínicas CPIC en América Latina pueden ayudar a que esta estrategia se cumpla en nuestro país, donde aún nos encontramos lejos de llegar a esos porcentajes en sus dos últimos parámetros.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atasilp, C., Chansriwong, P., Sirachainan, E., Reungwetwattana, T., Sirilertrakul, S., Chamnanphon, M., *et al.* (2020). Effect of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Thai Colorectal Cancer Patients Treated with Irinotecan-Based Chemotherapy. *Scientific Rep.* 10 (1), 1–10.

Acuna. M, Llop. E, Rothhammer. F.. Composición genética de la población chilena: las comunidades rurales de los valles de Elqui, Limarí y Choapa. 2000:128(6): 593-600

Barbarino, J. M., Haidar, C. E., Klein, T. E. y Altman, R. B. PharmGKB summary. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2014;24(3):177-183.

Bassam. Bj, Caetano-Anollés. G, Gresshoff. PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1991;196(1): 80–83.

Beutler, E. Gelbart, T. Demina, A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(14):8170-8174.

Beloukas, A., Psarris, A., Giannelou, P., Kostaki, E., Hatzakis, A., & Paraskevis, D. (2016). Infection, Genetics and Evolution Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe : An overview. *MEEGID*.

Carr, Daniel F, Charles la Porte, Munir Pirmohamed, Andrew Owen, and Claudia P Cortes. 2010. "Haplotype Structure of CYP2B6 and Association with Plasma Efavirenz Concentrations in a Chilean HIV Cohort." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (9): 1889–93.

Chenneville, Tiffany, Kemesha Gabbidon, Patricia Hanson, and Cashea Holyfield. 2020. "The Impact of COVID-19 on HIV Treatment and Research: A Call to Action." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (12): 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124548>.

Cortes, Claudia P., Andrew Owen, Ammara Chaikan, Marco Siccardi, Charles J. L. la Porte, and Guijun Zhang. 2013. "Correlates of Efavirenz Exposure in Chilean Patients Affected With Human Immunodeficiency Virus Reveals a Novel Association With a Polymorphism in the Constitutive Androstane Receptor." *Therapeutic Drug Monitoring* 35 (1): 78–83.

Cullen, B. R. (2003). Nuclear mRNA export: Insights from virology. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), 419–424.

Destá, Zeruesenay, Roseann S. Gammal, Li Gong, Michelle Whirl-Carrillo, Aditya H. Gaur, Chonlaphat Sukasem, Jennifer Hockings, et al. 2019. "Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2B6 and Efavirenz-Containing Antiretroviral Therapy." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 106 (4): 726–33.

Dickinson, Laura, Saye Khoo, and David Back. 2010. "Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Antiretrovirals: An Update." *Antiviral Research* 85 (1): 176–89.

Gaida, R., Truter, I., Grobler, C., Mandela, N., Africa, S., & Mandela, N. (2016). Incidence of neuropsychiatric side effects of efavirenz in HIV-positive treatment-naïve patients in public- sector clinics in the Eastern Cape Research design. *Southern African Journal of HIV Medicine*, 1–6.

Gammal, R. S., M. H. Court, C. E. Haidar, O. F. Iwuchukwu, A. H. Gaur, M. Alvarellós, C. Guillemette, et al. 2016. "Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 99 (4): 363–69.

Gao, Ya dong, Mei Ding, Xiang Dong, Jin jin Zhang, Ahmet Kursat Azkur, Dilek Azkur, Hui Gan, et al. 2021. "Risk Factors for Severe and Critically Ill COVID-19 Patients: A Review." *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 76 (2): 428– 55. <https://doi.org/10.1111/all.14657>.

Gobierno de Chile, 2022. Cifras oficiales COVID19.

Goede, A. L. De, Vulto, A. G., Osterhaus, A. D. M. E., & Gruters, R. A. (2014). Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis of HIV. *Annales Pharmaceutiques Francaises*.

Gras, L., Kesselring, A. M., Griffin, J. T., van Sighem, A. I., Fraser, C., Ghani, A. C., ... & de Wolf, F. (2007). CD4 cell counts of 800 cells/mm³ or greater after 7 years of highly active antiretroviral therapy are feasible in most patients starting with 350 cells/mm³ or greater. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45(2), 183-192.

Hill, W.G. Robertson, A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoret. Appl. Genetics*, 1968;38(6): 226-231.

Isaza, Carlos, Juan C. Sepúlveda-Arias, and Julieta Henao. 2009. "La Farmacogenómica En Medicina." *Colombia Medica* 40 (3): 327–46.

Kanti, S., Zahan, N., Afrose, S., Islam, T., Saha, S., Arif, S., ... Mizuguchi, M. (2014). HIV & AIDS Review Molecular epidemiology of HIV in Asia. *HIV & AIDS Review*, 13(2), 33–39.

Lamorde, M., Wang, X., Neary, M., Bisdomini, E., Nakalema, S., Byakika-Kibwika, Pauline Mukonzo, J. K., ... 1. (2018). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics of efavirenz 400 mg once daily during pregnancy and post-partum. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 67(5), 785–790.

Lampe, j. Bigler, j. Horner, n. Potter, J. UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians. *Pharmacogenetics*. 1999;9(3):341-350.

Lewontin, R. Kojima, K. The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution*. 1960;14(4):458-472.

Ma, Qing, Gene D Morse, Robin DiFrancesco, Richard C Reichman, Alan Forrest, Barry S Zingman, Charles S Venuto, et al. 2007. "Multidrug Resistance 1 Polymorphisms and

Trough Concentrations of Atazanavir and Lopinavir in Patients with HIV.” *Pharmacogenomics* 8 (3): 227–35. 7.

Mattevi, Vanessa S., and Carmela Fs Tagliari. 2017. “Pharmacogenetic Considerations in the Treatment of HIV.” *Pharmacogenomics* 18 (1): 85–98.

Naranjo, C. A., Busto, U., Sellers, E. M., Sandor, P., Ruiz, I., Roberts, E. A., ... & Greenblatt, D. J. (1981). A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 30(2), 239-245.

ONUSIDA. 2022. Hoja informativa — Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida. Retrieved from <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>

ONUSIDA. 2021. “Country Factsheets 2020 HIV and AIDS Estimates Chile.” *UNAIDS/AIDSinfo*, 1–6. <https://aidsinfo.unaids.org/%0D>.

ONUSIDA, 2022. Lo que las personas con VIH deben saber sobre el VIH y el COVID19. Organización Mundial de la Salud, 2019. Cuáles son las 10 principales amenazas a la salud.

Mendez, L. Lagos, M. Quiroga, T. Margozzini, P. Azocar, L. Molina, H. Et Al. Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena. *Revista médica de Chile*. 2013;141(10):1266-12745.

Moore, R. D., Keruly, J. C., Gebo, K. A., & Lucas, G. M. (2005). An improvement in virologic response to highly active antiretroviral therapy in clinical practice from 1996 through 2002. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 39(2), 195-198.

Richman, Dougl, As D, David M Margolis, Martin Delaney, Warner C Greene, Daria Hazuda, and Roger J Pomerantz. 2009. “The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection Can.” *SCIENCE* 323 (March): 1304–8.

Urso, R., Blardi, P., & Giorgi, G. (2002). A short introduction to pharmacokinetics. *European Review for Medical and Pharmacology Sciences*, 6, 33–44.

Rodríguez González, J. C., & Rodeiro Guerra, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(3), 495-507.

Santoro, Pablo, and Fernando Conde. 2013. "Tipos de Problemas de Adherencia Entre Las Personas Con VIH y Tendencias Emergentes En La Adherencia Al Tratamiento Antirretroviral (TAR): Resultados de Un Estudio Cualitativo." *Revista Multidisciplinar Del SIDA* 1: 41–58.

Satou, Y., Katsuya, H., Fukuda, A., Misawa, N., Jumpei, I., Uchiyama, Y., ... Melamed, A. (2017). Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model, (February), 1–12.

Spatzenegger, M., & Jaeger, W. (1995). Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug metabolism reviews*, 27(3), 397-417.

Sripichai, O. and S. Fucharoen, Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *J Med Assoc Thai*, 2007. 90(2): p. 394-8.

Trontelj, J, Marc. J, Zavaratnik. A, Bogataj. M, Mrhar. A. Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br J ClinPharmacol*. 2009;67(4): 437-44.

Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., & Charpentier, C. (2016). Infection Genetics and Evolution Hiv-2 molecular epidemiology. *MEEGID*, 1905.

Zeldin, Robert K., and Richard A. Petruschke. 2004. "Pharmacological and Therapeutic Properties of Ritonavir-Boosted Protease Inhibitor Therapy in HIV-Infected Patients." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (1): 4–9.

Zitko, Pedro, Carlos Beltrán, Fernando Mejía, Ana P Celi, María M Greco, Alejandro Afani, Ernesto Martínez-buitrago, et al. 2016. "Descripción de Las Características de 44 Centros de Atención VIH En 11 Países de América Latina ; Resultados Del Taller Latinoamericano de VIH." *Rev Panam Infectol* 18 (1): 16–28.

7. Anexos

Anexo 1. Acta de aprobación del proyecto de investigación y Consentimiento informado.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



1/2

10 NOV. 2015

ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 10 de noviembre de 2015, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Infectólogo (miembro suplente)

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"FARMACOGENÉTICA DE LA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL EN PACIENTES QUE VIVEN CON VIH: IMPLICANCIAS EN LA RESPUESTA CLÍNICA. HACIA UNA TERAPIA PERSONALIZADA"**, y cuyo investigador responsable es el Dr. Nelson Varela Figueroa, quien desempeña funciones en el Departamento de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso.*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Carta compromiso del investigador para entregar carta de aceptación de la dirección del Hospital San Juan de Dios, una vez que esta sea obtenida.*
- *Consentimiento Informado.*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) **Carácter de la población estudiada:** Cautiva no terapéutica.
- b) **Utilidad del Proyecto:** Información novedosa y relevante que relaciona perfiles genéticos con respuesta a tratamiento ART.
- c) **Riesgos y Beneficios:** Riesgo mínimo (punción venosa).

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



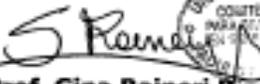
10 NOV. 2015

- d) Protección de los participantes: Si.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No Aplica.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto. Si.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 10 de noviembre de 2015.


Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

GRB/lom

C.C: - Archivo Proy. Nº 147-2015.
- Archivo ACTA AP-141.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

10 NOV. 2015

Colaboración en un estudio para evaluar factores genéticos que inciden en la efectividad y seguridad de los medicamentos utilizados en el tratamiento anti-retroviral en Chile

Estimado(a) señor(a).

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación titulado **"Farmacogenética de la Terapia Anti-retroviral en pacientes que viven con VIH: Implicancias en la respuesta clínica. Hacia una terapia personalizada"**

Este estudio será realizado en colaboración, entre la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y el Hospital San Juan de Dios. El investigador científico responsable es el Dr. Nelson Varela Figueroa, académico de dicha universidad (Celular: 85001351, e-mail: nvarela@med.uchile.cl), y el investigador clínico colaborador es el Dr. Leonardo Chanqueo, Infectólogo del Hospital San Juan de Dios (Teléfono: 225742387, e-mail: leonardo.chanqueo@redsalud.gov.cl)

OBJETIVO

Este estudio tiene por objetivo obtener información que en un futuro permitiría diseñar un perfil genético personalizado para optimizar el tratamiento anti-retroviral, de modo que se observen menores efectos adversos y mejor respuesta clínica (mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento farmacológico) y que por ende, permitan evitar costos innecesarios.

PROCEDIMIENTOS

Su colaboración en este estudio consiste en:

- 1.- la donación voluntaria de una muestra sanguínea, de aproximadamente 6 ml, la cual será extraída con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo. Esta muestra será utilizada para obtener DNA (material genético) para estudiar genes involucrados en la respuesta a la terapia anti-retroviral.
- 2.- su colaboración voluntaria en este estudio, implica que usted deberá aceptar la extracción de datos desde su ficha clínica, datos que sólo serán extraídos por el personal clínico que por normativa y protocolos hospitalarios tengan acceso a su ficha clínica. Estos datos son específicamente:
 - Resultados de exámenes de laboratorio
 - Prescripción de medicamentos
 - Reportes de reacciones adversas a medicamentos
- 3.- finalmente deberá responder un cuestionario muy sencillo, de 6 preguntas, para evaluar adherencia al tratamiento.

RIESGOS / BENEFICIOS

La única molestia, eventual, puede ser la aparición de un pequeño hematoma (moretón) en la zona de toma de muestra sanguínea, lo cual es infrecuente y no representa riesgo relevante para su estado físico y/o emocional.

No existirá un beneficio directo a su persona, sin embargo, los resultados obtenidos gracias a su participación, podrían a futuro, permitir que nuevos pacientes reciban esquemas terapéuticos (anti-retrovirales) personalizados, con menos reacciones adversas, y por ende, más efectivos.

Cualquier resultado válido de este estudio, que haya tenido influencia en su tratamiento, será informado a usted por el equipo investigador y clínico de este proyecto, entregando los consejos y aclaraciones que usted necesite

10 NOV. 2015



COSTOS

Los procedimientos que se realizarán en este estudio son los mismos que se realizan como parte del protocolo de atención de TODOS los pacientes del Hospital, y el costo está asociado a la provisión de salud que cada paciente tenga. Participar en este estudio no significa costo económico extra para usted.

Todos los análisis o exámenes propios del estudio y que no son necesarios para el tratamiento habitual de su enfermedad, serán financiados por el presente proyecto de investigación y deberán ser aprobados por usted.

CONFIDENCIALIDAD

Se le asegura que tanto el investigador principal como los demás integrantes del grupo de investigación, garantizarán la privacidad de la información que surja de sus análisis genéticos.

La muestra que usted donara será almacenada mediante un código, el cual no revelará información personal y a la cual sólo tendrá acceso los investigadores del estudio. Los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales, y pueden ser dados a conocer a usted, solamente una vez que estos se encuentren disponibles y en la forma y formato que el comité de ética lo establezca. Además es necesario obtener datos clínicos relevantes desde su ficha clínica, para esto, su identidad será codificada, al igual que sus muestras sanguíneas. Sólo su equipo tratante (clínico) tendrá acceso a su ficha clínica.

Sus muestras serán almacenadas en el Laboratorio de Farmacogenética CQF de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la responsabilidad del Profesor Dr. Nelson Varela y serán utilizadas exclusivamente para estudiar genes involucrados en la respuesta a la terapia anti-retroviral.

Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación no revelará su nombre, RUT o cualquier información que pudiese revelar su identidad ya que se trabajará con un código asignado al azar, ejemplo: Paciente 035-2015

VOLUNTARIEDAD

Su decisión de participar en el estudio es absolutamente voluntaria, usted tiene el derecho de negarse a participar y podrá retirarse de él, cuando usted lo estime conveniente, sin tener que dar ninguna explicación. Incluso podría solicitar la destrucción de su muestra, sin expresar razón ni causa alguna. Si usted no desea participar en este estudio o decide retirarse de él, esto no condiciona su permanencia como paciente en el sistema de salud, y no significará ningún perjuicio para usted.

DERECHO DEL PARTICIPANTE

Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio, puede comunicarse con el Dr. Nelson Varela F., investigador científico responsable (fono: 2-29770743, celular: 85001351, email: nvarela@med.uchile.cl), o con Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., fono: 2-9789536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

Nota: Este consentimiento informado puede contener palabras o frases que usted no comprenda. Por favor, consultar al médico responsable o al investigador del estudio que le está tomando este consentimiento, sobre cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente, antes o durante su participación.