



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL  
GEN DPYD ASOCIADOS CON DISMINUCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
Y SU RELACIÓN CON LA PROPORCIÓN DE ANCESTRÍA  
EN POBLACIÓN ECUATORIANA

Autora

Camila Alexandra Farinango Páez

Año  
2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL  
GEN DPYD ASOCIADOS CON DISMINUCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
Y SU RELACIÓN CON LA PROPORCIÓN DE ANCESTRÍA EN POBLACIÓN  
ECUATORIANA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. Emilia Vásquez Domínguez

Autora

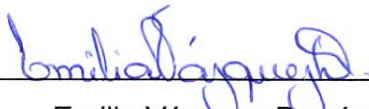
Camila Alexandra Farinango Páez

Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación de la frecuencia de los polimorfismos del gen DPYD asociados con disminución de actividad enzimática y su relación con la proporción de ancestría en población ecuatoriana, a través de reuniones periódicas con el estudiante Camila Alexandra Farinango Páez en el semestre 202010 orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Emilia Vásquez Domínguez

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

CI: 1709009243

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Determinación de la frecuencia de los polimorfismos del gen DPYD asociados con disminución de actividad enzimática y su relación con la proporción de ancestría en población ecuatoriana, de Camila Alexandra Farinango Páez, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Eduardo Tejera Puente

Doctor en Ciencias Farmacéuticas – Especialidad Bioquímica

CI: 1756501977

## DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and strokes, positioned above a horizontal line.

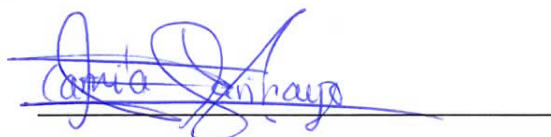
Raúl Alejandro Cabrera Andrade

Máster en Biología Molecular, Bioquímica y Biomedicina

CI: 1715462733

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”



Camila Alexandra Farinango Páez

C.I. 1722775077

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por haber sido mi apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A mi director científico Alejandro Cabrera y mi docente guía Emilia Vásquez, por haberme guiado y ofrecido el apoyo para desarrollarme profesionalmente.

A la Dirección General de Investigación, especialmente a Byron Freire e Irina Villacrés por brindarme su guía y ayuda para culminar este proyecto.

## DEDICATORIA

A una persona muy especial, mi padre, que en el lugar que te encuentres, lejos del sufrimiento y bien cuidado, sé que estas orgulloso de mí.

Al ser humano más increíble, valiente y fuerte, mi madre, mi pilar de vida, que siempre ha estado conmigo dándome su apoyo, palabras de aliento y sobre todo su amor incondicional en todo momento.

A mis hermanos, Alejandro y Karla, que han sido mi fuente de inspiración para ser mejor cada día y por enseñarme que con esfuerzo y amor todo es posible.



## RESUMEN

La aplicación de quimioterapia basada en el uso de fármacos de la familia de las fluoropirimidinas (5-fluorouracilo y capecitabina) es ampliamente utilizada en el tratamiento de tumores malignos gastro-intestinales, próstata, cuello uterino, mama, entre otros en el Ecuador. El nivel de respuesta ante el uso de estos fármacos en los tratamientos quimioterapéuticos no es el mismo a nivel poblacional, y puede deberse al desconocimiento de la respuesta farmacológica que se asocia con la variación dentro de las poblaciones. Estas variaciones están asociadas a la reducción de actividad enzimática de la dipirimidina deshidrogenasa (DPD), metabolizador principal de la familia de fármacos de las fluoropirimidinas. La identificación de variantes genéticas del gen DPYD que codifica para la enzima DPD, pueden proporcionar una base para personalizar los cuadros quimioterapéuticos en función del paciente. En este estudio se analizó 418 individuos entre ellos, mestizos, afroecuatorianos y poblaciones indígenas. Se genotipificaron por medio de secuenciación Sanger las 4 variantes más prevalentes del gen DPYD a nivel mundial: DPYD\*2A (rs3918290), 2846A>T (rs67376798), 1679T>G (rs55886062) y 1236G>A (rs56038477). Se calcularon las frecuencias alélicas, y se correlacionaron con la proporción de ancestría que permitió identificar qué variantes del gen DPYD pueden asociarse con las diferentes poblaciones a nivel mundial. Finalmente, los datos obtenidos demuestran que ciertas variantes del gen DPYD pueden estar más presentes en poblaciones nativo-americanas o afrodescendientes.

## ABSTRACT

The application of chemotherapy based on the use of drugs from the fluoropyrimidine family (5-fluorouracil and capecitabine) is widely used in the treatment of malignant gastro-intestinal tumors, prostate, cervix, breast, among others in Ecuador. The level of response to the use of these drugs in chemotherapeutic treatments is not the same at the population level and may be due to unaware of the pharmacological response that is associated with variation within populations. These variations are associated with the reduction of the enzymatic activity of dipyrimidine dehydrogenase (DPD), the main metabolizer of the fluoropyrimidine family of drugs. The identification of genetic variants of the DPYD gene that codes for the DPD enzyme can provide a basis for customizing the chemotherapeutic tables according to the patient. In this study, 418 individuals including mestizos, Afro-Ecuadorians and indigenous populations were analyzed. The 4 most prevalent variants of the DPYD gene worldwide were genotyped by Sanger sequencing: DPYD \* 2A (rs3918290), 2846A> T (rs67376798), 1679T> G (rs55886062) and 1236G> A (rs56038477). Allelic frequencies were calculated and correlated with the proportion of ancestry that allowed identifying which variants of the DPYD gene can be associated with different populations worldwide. Finally, the data obtained demonstrate that certain variants of the DPYD gene may be more present in Native American or Afro-descendant populations.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	4
1.3 Objetivo general.....	5
1.4 Objetivos específicos.....	6
1.5 Justificación de la investigación .....	6
2. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 Quimioterapia.....	7
2.2 Fármacos usados en quimioterapia.....	9
2.2.1 Agentes Antineoplásicos.....	9
2.2.1.1 Antimetabolitos .....	10
2.2.1.2 Flouropirimidinas; 5-fluorouracilo y capecitabina .....	11
2.3 Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo .....	12
2.3.1 Dipurimidina Deshidrogenasa (DPD) .....	12
2.4 Gen DPYD .....	13
2.4.1 Descripción del gen .....	13
2.4.2 Variantes del gen a nivel poblacional.....	13
2.4.3 Variantes y reducción de actividad enzimática .....	14
2.5 Farmacogenética.....	15
2.6 Estadísticos genético-poblacionales.....	15
2.6.1 Frecuencias genotípicas .....	15
2.6.2 Frecuencia alélica .....	16
2.6.3 Equilibrio Hardy-Weinberg .....	17
2.7 Pruebas no paramétricas .....	17
2.7.1 Kruskal-Wallis .....	17
3. PROCEDIMIENTOS.....	18
3.1 Población y muestra .....	18
3.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	18

3.2.1 Extracción de ADN.....	18
3.2.2 Cuantificación de ADN .....	20
3.2.3 Amplificación de los 5 polimorfismos del gen DPYD asociados a reducción de actividad enzimática .....	20
3.2.4 Visualización de los productos de amplificación .....	22
3.2.5 Secuenciación.....	22
3.2.6 Análisis de Secuencias .....	22
3.2.7 Análisis de las proporciones de ancestría.....	22
3.3 Evaluación estadística de los resultados.....	23
4. Resultados y Discusión.....	23
4.1 Amplificación de los 5 polimorfismos del gen DPYD .....	23
4.2 Análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas .....	25
4.3 Correlación de las frecuencias genotípicas y alélicas con las proporciones de ancestría.....	33
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
5.1 Conclusiones.....	43
5.2 Recomendaciones.....	44
REFERENCIAS .....	45

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

En el Ecuador el cáncer es un problema de salud pública, constituye la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (Cueva & Yépez, 2014). En 1980, el cáncer representaba el 6% de las muertes, en el 2016, aumentó al 16%, y para el 2020 se estima aproximadamente 31420 casos nuevos de cáncer (SOLCA Quito, 2017).

Hay muchos tipos de tratamiento para el cáncer y cada tumor tiene una identidad propia que dependerá de las determinantes y el control, según el sitio o sus características morfológicas (DeVita & Chu, 2018).

Uno de los tratamientos contra el cáncer, es la quimioterapia, que tiene como objetivo inducir la erradicación completa de la enfermedad. El proceso puede ser a largo plazo, donde los agentes individuales o la quimioterapia de combinación, se administran a intervalos o en ciclos, y depende en gran medida del tipo y las características del tumor (Larriva et al., 2013).

Dentro de los tratamientos quimioterapéuticos se usan varios agentes anticancerígenos, que actúan según el punto del ciclo celular en el que están más activos, y se clasifican en; agentes alquilantes, anticancerígenos hormonales, antimetabolitos y agentes derivados de productos naturales o semisintéticos (Chun, 2009).

El modo de acción general de los agentes alquilantes se centra alrededor de la formación de un compuesto intermedio de ión etilenimonio, que es altamente

inestable y forma enlaces covalentes con bases de ADN, siendo la guanina la más vulnerable al ataque (Larriva et al., 2013). Las hormonas y los antagonistas hormonales (antihormonas) son un grupo diverso de medicamentos que son beneficiosos para la terapia del cáncer. Algunas hormonas alteran el entorno celular y afectan la permeabilidad de la membrana, de manera que, afectará el crecimiento celular. Estos medicamentos, que son agentes hormonales, inhiben la proliferación del tumor al bloquear o antagonizar la sustancia natural que estimula el crecimiento del tumor (Fischer et al., 2018).

Los agentes anticancerígenos antimetabolitos, tienen una estructura similar a los sustratos de las enzimas involucradas en la síntesis del ADN, un proceso que eventualmente interrumpe la estructura y funcionalidad del mismo, y conduce a la muerte de las células tumorales (Larriva et al., 2013). En quimioterapia, los medicamentos a menudo se usan como parte de terapia multimodal, es decir, junto con la cirugía y / o la radioterapia, para mantener estable el tratamiento (American Cancer Society, 2014). La respuesta de los medicamentos en quimioterapia puede determinarse por el nivel de enzimas o proteínas transportadores de fármacos expresadas dentro de un tumor que son esenciales para la captación, activación y eliminación de los agentes cancerosos. Los niveles de expresión pueden mostrar variación intrapaciente (entre tumores dentro del mismo paciente) o interpaciente (entre pacientes) (Re et al., 2017). Esta variación se explica por medio de la farmacogenética, que se define como el estudio de cómo los genes regulan la respuesta a un medicamento. Además, puede tratar las diferencias genéticas específicas del paciente como un todo, descritas como polimorfismos genéticos, donde ciertos pacientes muestran diferencias hereditarias en la expresión de los genes que codifican a las enzimas que metabolizan a los medicamentos (Kozyra et al., 2017).

Entre los quimioterapéuticos clasificados como antimetabolitos, el 5-fluorouracilo (5-FU) es uno de los agentes clínicos más estudiados (O'Donnell & Dolan, 2009).

El 5-FU y su profármaco, la capecitabina, son medicamentos que pertenecen a la clase de fluoropirimidinas. Se usa para varios tratamientos oncológicos y se administra solo o en combinación con otros agentes farmacológicos como irinotecán, oxaliplatino, ciclofosfamida, epirubicina, para tratar a los cánceres de cabeza y cuello, cuello uterino, mama y tracto gastrointestinal (Yen & McLeod, 2007).

5-FU una vez dentro del organismo, más del 80% de la dosis administrada se transforma en metabolitos inactivos. En cambio, el 20% restante se transforma en metabolitos responsables del efecto terapéutico como la fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina difosfato (FdUDP) y fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) (Dean, 2012). Como resultado de la transformación de estos metabolitos, la enzima dihipirimidina deshidrogenasa (DPD) controla la velocidad de inactivación de 5-FU, ya que es una enzima reguladora de las vías catabólicas de las pirimidinas y la convierte en un importante marcador farmacológico asociado con toxicidad (Re et al., 2017).

La actividad enzimática de DPD es variable entre individuos. La deficiencia de DPD ocurre en un 4 a 5% de la población y resulta en una disminución de hasta el 50% en su actividad. Esto puede llevar a un aumento en los metabolitos activos de 5-FU, y acumulación dentro del hígado, lo que se asocia con un mayor riesgo de toxicidad grave e incluso ocasionar la muerte. Además, Henricks reporta que alrededor del 39% al 61% de pacientes presentan una respuesta tóxica a 5-FU, relacionado a una actividad baja de DPD, y esta disminución en la actividad enzimática se debe principalmente a mutaciones genéticas del gen que codifica para esta enzima que es la dihidropirimidina deshidrogenasa humana (DPYD) (Linda M Henricks et al., 2015).

El gen de la enzima DPD se denomina dihidropirimidina deshidrogenasa humana (DPYD), está ubicado en el cromosoma 1p21.3, contiene 23 exones y mide

aproximadamente 843 kb. Algunas de las variaciones genéticas de DPYD están asociadas a una deficiencia enzimática (Matáková et al., 2017).

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológico, por sus siglas en inglés NCBI, existen 193954 variantes descritas para el gen DPYD, y de estas variantes hay alrededor de 7600 polimorfismos dentro de las regiones codificantes y no codificantes. Sin embargo, se han determinado solo 35 polimorfismos asociados a la baja actividad enzimática o mutaciones no funcionales (Deenen et al., 2016). Dentro de estos polimorfismos reportados, se han estudiado cuatro polimorfismos que poseen validez clínica como DPYD\*2<sup>a</sup> (rs3918290), 2846A>T (rs67376798), 1679T>G (rs55886062) y 1236G>A (rs56038477) (Longley, Harkin, & Johnston, 2003). Estos polimorfismos o mutaciones se relacionan con cambios estructurales en las zonas no codificantes y en los residuos de la enzima. Se cree que algunas de estas diferencias genéticas son responsables de la alta variabilidad en la actividad de la enzima (Lunenburg et al., 2018).

De acuerdo con Meulendijks, en su investigación donde incluyen 7356 pacientes de 8 estudios distintos, se demostró un riesgo relativo de 4.4 veces de toxicidad severa inducida a fluoropirimidinas en portadores de la variante 1679T>G, y de 1.59 y 3.02 a toxicidad severa para portadores de los polimorfismos 1236G>A, 2846A>T respectivamente (Meulendijks et al., 2015).

## **1.2 Planteamiento del problema**

De acuerdo con el Registro Nacional de Tumores, los tumores malignos más incidentes tanto en hombres como en mujeres son; próstata, piel estómago, mama, tiroides, pulmón, colon, linfomas, útero y ovarios. Para el tratamiento de estos tumores durante las últimas 5 décadas en el Ecuador, se utilizan varios



agentes quimioterapéuticos como irotecán, oxaliplatino, ciclofosfamida, epirubicina, anticuerpos monoclonales y el más usado 5-FU (Organization, 2015).

Matus menciona que 5-FU y capecitabina en conjunto con otros fármacos, demuestran ser eficientes para los tumores anteriormente mencionados (Matus-Santos et al., 2015) . Sin embargo, en el estudio realizado por Henricks, demuestra que alrededor del 2.7% de individuos que fueron diagnosticados con cáncer, y tratados con 5-FU, presentan una deficiencia total de actividad de la enzima codificada por el gen DPYD, desarrollando toxicidad a este fármaco (Henricks et al., 2015). Asimismo, otros estudios han demostrado que poblaciones afrodescendientes exhiben mayor deficiencia enzimática de forma parcial, de manera que, en mujeres esta deficiencia representa el 12.3% y en hombres el 4%. Por otro lado en poblaciones caucásicas, en mujeres presenta el 3.4% y en hombres el 1.9% (L. M. Henricks, 2017).

El desconocimiento de la respuesta farmacológica que se asocia con la variación genética dentro de las poblaciones es uno de los factores que limita el desarrollo de los tratamientos del cáncer. Por lo que es importante determinar la frecuencia de marcadores farmacogenéticos y correlacionarlas en función de nuestras poblaciones étnicas. Por lo tanto, es necesario desarrollar metodologías de genotipificación en la población ecuatoriana, que nos permita generar líneas de estudio relacionados a la farmacogenética.

### **1.3 Objetivo general**

Determinar la frecuencia de los polimorfismos del gen DPYD asociados con disminución de actividad enzimática y su relación con la proporción de ancestría en población ecuatoriana

#### 1.4 Objetivos específicos

- Determinar en población ecuatoriana las frecuencias alélicas y genotípicas de los 5 polimorfismos del gen DPYD más comunes a nivel mundial, asociados con reducción en la eficiencia de degradación del 5-fluorouracilo
- Correlacionar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes moleculares del gen DPYD encontradas con sus respectivas proporciones de ancestría obtenidas

#### 1.5 Justificación de la investigación

La identificación de variantes genéticas que se relacionan con disminución de actividad enzimática de la enzima DPD pueden proporcionar una base para personalizar los cuadros quimioterapéuticos en función del paciente (Kozyra et al., 2017), así como lo hace el Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica por sus siglas en inglés (CPIC), que es un consorcio internacional dedicado a facilitar el uso de pruebas farmacogenéticas para la atención del paciente. Este se encarga de asignar niveles a genes/medicamentos, que se representan por un rango de 0 a 2 y las letras A y B, donde la letra A representa la actividad de la enzima, y B el genotipo del paciente. El rango de actividad enzimática de 0 a 0.5 representa a un metabolizador pobre, de 1 a 1.5 metabolizador intermedio y 2 metabolizador normal, y con ello pueden administrar específicamente el medicamento que le resulte más eficiente dentro de la quimioterapia (Amstutz et al., 2018).

Hasta ahora no existe ningún estudio en población ecuatoriana que determine las variantes farmacogenéticas presentes en nuestros grupos étnicos asociados con toxicidad a fluoropirimidinas..

En el Ecuador se usan tratamientos basados en modelos americanos y europeos que son orientadas para un solo tipo de población, cuando el país posee una población trihíbrida, es decir, que descendemos de poblaciones caucásicas, africanas y nativo-americanas, por lo que no existe un enfoque específico para nuestra población. (Arizaga, 2015).

Si existe un riesgo de toxicidad a las fluoropirimidinas presentes en nuestra sociedad ecuatoriana, se puede desarrollar una herramienta que ayude a mejorar los tratamientos de rutina de pacientes con cáncer en el país, por medio de la identificación de las frecuencias genotípicas de las variantes más prevalentes del gen DPYD, correlacionarlas en función de las proporciones de ancestría en nuestra población y con ello desarrollar una metodología de cribado genético para marcadores farmacogenéticos.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Quimioterapia**

La quimioterapia, la cirugía y la radioterapia son los tipos más comunes de tratamientos contra el cáncer disponibles en la actualidad. La historia de la quimioterapia comenzó a principios del siglo XX, pero su uso en el tratamiento del cáncer comenzó en la década de 1930 (Anampa, 2015).

El desarrollo de la quimioterapia en las décadas de 1950 y 1960 dio como resultado estrategias terapéuticas curativas para pacientes con varios tipos de tumores sólidos (Fischer et al., 2018). Estos avances confirmaron el principio de que la quimioterapia podría realmente curar el cáncer y proporcionaron la razón para integrar la quimioterapia en los programas de modalidad combinada con

cirugía y radioterapia en las etapas iniciales de la enfermedad para proporcionar un beneficio clínico (Haddow, 2014).

Durante la Primera y la Segunda Guerra Mundial, se observó que los soldados expuestos al gas mostaza experimentaron niveles disminuidos de leucocitos. Esto llevó al uso de mostaza de nitrógeno como el primer agente de quimioterapia para tratar los linfomas, un tratamiento utilizado por Gilman en 1943 (Haddow, 2014). En los años siguientes, se sintetizaron fármacos alquilantes como la ciclofosfamida y el clorambucil para combatir el cáncer. Heidelberger desarrolló un medicamento para tumores sólidos, el 5-fluorouracilo (5-FU), que es un importante agente de quimioterapia contra el cáncer gastrointestinal, de cabeza y cuello (Kim, 2016).

La quimioterapia se utiliza actualmente en tres contextos clínicos principales: quimioterapia de inducción, adyuvante y quimioterapia de combinación. La quimioterapia de inducción tiene el objetivo de lograr una citorreducción significativa, y el resultado puede ser, una respuesta completa, donde hay desaparición de la enfermedad durante un mes; respuesta parcial, donde hay una reducción en el volumen del tumor de 50% o más, y respuesta estable, que se define como una disminución en el volumen del tumor de menos del 50% sin nuevos sitios de enfermedad durante al menos un mes (Cannon et al 2016).

La quimioterapia adyuvante, se administra después de la erradicación de la enfermedad con un tratamiento localizado, como cirugía o radioterapia, que se utiliza para tratar la enfermedad y prevenir la recurrencia local. La administración de quimioterapia neoadyuvante se realiza en ciclos, y cada ciclo consiste en un período de tratamiento seguido de una fase de reposo. Los agentes de quimioterapia se pueden administrar por vía oral o intravenosa durante un número variable de ciclos (Devisetty & Wong, 2013).

La quimioterapia de combinación con agentes citotóxicos convencionales logra varios objetivos clave que no son posibles con la terapia de un solo agente. Primero, proporciona una muerte celular máxima dentro del rango de toxicidad tolerado por el huésped para cada medicamento, siempre y cuando la dosis no esté comprometida. En segundo lugar, proporciona una gama más amplia de interacción entre fármacos y células tumorales con diferentes anomalías genéticas en una población tumoral heterogénea. Finalmente, puede prevenir y / o retardar el desarrollo posterior de la resistencia celular a los medicamentos (Drusano, 2017).

## **2.2 Fármacos usados en quimioterapia**

De acuerdo con el Ministerio de Salud Pública y el Consejo Nacional de Salud, los fármacos usados en quimioterapia se dividen en agentes, antineoplásicos, inmunoestimulantes y agentes Inmunosupresores (Nacional De Salud, 2013).

### **2.2.1 Agentes Antineoplásicos**

Los fármacos citotóxicos se introdujeron en la medicina como agentes antineoplásicos por su capacidad para interrumpir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en células cancerosas (Frangou, 2016).

Varios tipos de fármacos antineoplásicos actúan sobre varias o en una fase del ciclo celular y también sobre los mecanismos del control de la proliferación celular. La respuesta terapéutica ante estos agentes se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación de la misma (Surapaneni & Hui, 2017).

Los agentes antineoplásicos puede tener diversos modos de acción sobre la célula tumoral, y su clasificación se basa en la diana o en la zona de acción del antineoplásico (Surapaneni, & Hui, 2013). Se dividen en antineoplásicos que actúan sobre el ADN, dentro de estos tenemos a los agentes alquilantes, derivados de platino, antibióticos: antracilcinas y analogos, derivados de camptotecinas y antimetabolitos. También tenemos a los antineoplásicos que actúan sobre la mitosis sin afectar al ADN, antineoplásicos sobre factores extracelulares, que pueden ser los antagonistas de estrógenos y androgenos, a los interferones, y a los antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario (Papadimitraki & Boumpas, 2007).

#### **2.2.1.1 Antimetabolitos**

Estos son análogos de las bases de los ácidos nucleicos, que se convierten en nucleótidos y se incorporan al ADN. Esta similitud estructural permite que esta clase de agentes antitumorales sirvan como sustratos para enzimas celulares importantes (Szucs & Jones, 2016). La eficacia de los antimetabolitos más importantes contra un rango de células tumorales, se basa en la inhibición de las vías de síntesis de nucleósidos, de purinas o pirimidinas que se requieren para la síntesis de ADN (Thirumaran & Gilman, 2007).

Los antimetabolitos se dividen en; inhibidores de la biosíntesis de purinas y pirimidinas, estas drogas pueden interactuar con el ADN de dos maneras: ya sea actuando como análogos estructurales de precursores e intermedios a lo largo de la cadena sintética y, por lo tanto, interfiriendo con la síntesis de bases de purinas y pirimidinas; o comportándose como bases "falsas" en el ensamblaje de la doble hélice del ADN durante la replicación y la transcripción (Kim et al., 2016).

Los análogos de pirimidinas actúan como inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos de las pirimidinas *de novo*, o después de la conversión a los nucleótidos, por lo que interfieren con la función normal. En algunos casos los

análogos de pirimidinas son inhibidores competitivos, que al incorporarse a los ácidos nucleicos en lugar de las pirimidinas normales van a interferir en la función normal del ARN y ADN (Engelking, 2015). Y por último a los análogos de nucleósidos, tienen una estructura generalizada que consiste en una base de purina o pirimidina unida a un azúcar de desoxirribosa, se fosforilan intracelularmente mediante la desoxicitidina quinasa en forma de trifosfato, que se incorpora al ADN. Esto interfiere con la elongación de la cadena de ADN a través de la inhibición de la ADN polimerasa y también reduce el conjunto de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) disponibles para la replicación del ADN al inhibir la enzima ribonucleótido reductasa (Aronson, 2016).

#### **2.2.1.2 Fluoropirimidinas; 5-fluorouracilo y capecitabina**

Las fluoropirimidinas (5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina y tegafur) se usan ampliamente para el tratamiento de varios tumores sólidos, incluidos los cánceres de mama, gastrointestinal, cabeza, cuello, próstata, entre otros, y se administran en combinación con otros agentes antineoplásicos (Nies, 2015).

Tanto la capecitabina como el tegafur son profármacos inactivos que se metabolizan a través del hígado y dentro del tejido tumoral se convierte a 5-FU. Este (5-FU) es un análogo de la base pirimidínica uracilo, en la que sustituye un átomo de hidrogeno en la posición 5' del anillo de pirimidina por un átomo de flúor (Diasio & Harris, 1989).

El mecanismo principal de la activación del 5-FU es la conversión a monofosfato de fluorodeoxiuridina, que inhibe la enzima timidilato sintasa, y esta actúa en la síntesis de purina y pirimidina (Campbell et al., 2016). El daño resultante se produce debido a una reparación de la escisión de la base que causa la fragmentación del ADN y, en última instancia, la muerte celular. Además, el

metabolito trifosfato de fluorouridina puede incorporarse al ARN en lugar del trifosfato de uridina e interferir con el procesamiento del ARN y la síntesis de proteínas (Longley et al., 2003).

### **2.3 Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo**

La activación del 5-fluorouracilo tiene lugar en las células tumorales, es un análogo de uracilo que sustituye con un átomo de flúor en la posición C-5 en lugar de un átomo de hidrógeno, este se convierte intracelularmente en varios metabolitos activos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) y trifosfato de fluorouridina (FUTP): estos metabolitos activos interrumpen la síntesis de ARN y la acción de la timidato sintasa (TS) (Longley et al., 2003). La FUTP se incorpora al ARN y causa un deterioro en el procesamiento y funcionamiento del ARN, lo que altera el metabolismo celular y la viabilidad de esta. Y la FdUMP al ser un análogo de la desoxiuridilato (dUMP) va a impedir que la TS catalice la reacción de síntesis del timidato que es una molécula esencial para la formación de desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP), que son metabolitos necesarios para la reparación del ADN, evitando así la proliferación de las células tumorales (Focaccetti et al., 2015).

#### **2.3.1 Dipirimidina Deshidrogenasa (DPD)**

La dihidropirimidina deshidrogenasa es una proteína homodimérica del tipo oxidoreductasa que requiere nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para su activación, contiene flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenín dinucleótido (FAD), y un grupo de hierro-azufre en cada subunidad. La enzima se encuentra principalmente en el citosol del hígado, donde cataliza la reducción de 5-fluorouracilo y pirimidinas relacionadas (Re et al., 2017). La conversión mediada por dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) de 5-FU en



dihidrofluororacilo (DHFU) es el paso limitante de la velocidad del catabolismo por 5-FU en células normales y tumorales (Rustum, 2003).

## **2.4 Gen DPYD**

### **2.4.1 Descripción del gen**

Dihidropirimidina deshidrogenasa humana (DPYD) es el gen que codifica para la enzima dipirimidina deshidrogenasa (DPD), que participa en la degradación de la base de pirimidina, está ubicado en el cromosoma 1p21.3, contiene 23 exones y mide aproximadamente 843 kb (NIH, 2011).

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológico, por sus siglas en inglés NCBI, existen 193954 variantes descritas para el gen DPYD, y de estas variantes hay alrededor de 7600 polimorfismos dentro de las regiones codificantes y no codificantes. Además, solo se han determinado 35 polimorfismos que están relacionados con la deficiencia de la actividad enzimática de DPD (Deenen et al., 2016).

### **2.4.2 Variantes del gen a nivel poblacional**

Dentro de los 35 polimorfismos que se asocian con la deficiencia de la actividad de la enzima DPD, existen cuatro polimorfismos DPYD\*2<sup>a</sup> (rs3918290), 2846A>T (rs67376798), 1679T>G (rs55886062) y 1236G>A/HapB3 (rs56038477) que son unos de los más frecuentes a nivel poblacional (Pratt et al., 2017) .

La variante DPYD\*2<sup>a</sup> (rs3918290), tiene una frecuencia del 0,8% en población afroamericana y caucásica, 0,06% en población africana y 0,5 % en población asiática. En la variante 2846A>T (rs67376798) tiene una frecuencia del 0,8% en población afroamericana, 0,4% en caucásicos, 0,06 % en asiáticos y africanos. Para la variante 1679T>G (rs55886062) tiene una frecuencia de 0,06% en población caucásica, y por último a la variante 1236G>A/HapB3 (rs56038477) tiene una frecuencia del 0,8% en población afroamericana, 2,04 en caucásicos, 1,81% en asiáticos y 0,2% en africanos (LOVD, 2004).

### **2.4.3 Variantes y reducción de actividad enzimática**

El gen DPYD es altamente polimórfico con alrededor de 16,000 variantes, aunque solo unas pocas han demostrado influir en la actividad de la enzima DPD. La variación genética en DPYD se clasifica en dos grupos: i) variantes funcionales centradas en variantes de sitio de empalme y no sinónimas, y en regiones de codificación de genes, ii) variantes de la región no codificante centradas en mutaciones más completas, incluso fuera de la región codificante.

Dentro de las variantes hay cuatro polimorfismos que tienen validez clínica DPYD\*2<sup>a</sup> (rs3918290), 2846A>T (rs67376798), 1679T>G (rs55886062) y 1236G>A/HapB3 (rs56038477) (Shrestha et al., 2018).

La variante más estudiada es DPYD\*2<sup>a</sup> denominando IVS14 + 1G> A, o rs3918290 es una mutación puntual en el sitio de empalme del intrón 14, provoca la omisión de todo el exón 14 y, por lo tanto, da como resultado una enzima no funcional, la variante no sinónima 2846A>T (rs67376798) está relacionada a un cambio de aminoácido localizado cerca del motivo hierro-azufre provocando una interferencia con la unión del cofactor, otra variante no sinónima es 1679T>G (rs55886062) causa el cambio de aminoácidos en un dominio de unión al

mononucleótido flavínico de DPD y como resultado la desestabilización de la proteína, y por último la variante 1236G>A/HapB3 (rs56038477), no se tiene mucha información acerca de esta variante pero se cree que promueve al splicing alternativo (GeneCards, 2018). Estas variantes DPYD no funcionales están asociadas con una baja actividad de DPD, que se relaciona a un mayor riesgo de toxicidad con fluoropirimidinas (Pratt et al., 2017).

## **2.5 Farmacogenética**

La farmacogenética analiza cómo la composición genética de un individuo afecta su respuesta a los medicamentos. Describe la influencia de la variación genética adquirida y hereditaria en la respuesta al fármaco en pacientes al correlacionar la expresión génica o los polimorfismos de un solo nucleótido con farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco) y farmacodinámica (efectos mediados por los objetivos biológicos del fármaco) (Wigle, 2019).

La farmacogenética es un factor importante para considerar al seleccionar y dosificar terapias contra el cáncer. Los estudios farmacogenómicos han demostrado una correlación entre la eficacia del fármaco y la toxicidad con las variaciones del genoma del paciente. La determinación de polimorfismos en enzimas metabolizantes xenobióticas antes de la administración de quimioterapia podría sugerir nuevas estrategias para optimizar la quimioterapia en pacientes individuales (Matsusaka & Lenz, 2015).

## **2.6 Estadísticos genético-poblacionales**

### **2.6.1 Frecuencias genotípicas**

Las frecuencias genotípicas es una proporción que representa el porcentaje de los alelos en un locus definido dentro de una población. Para obtener la frecuencia genotípica, se suma el número de individuos que posean el genotipo estudiado y se divide para el número total de individuos de la muestra (Egeland, Kling, & Mostad, 2016).

$$f(G) = \frac{\# \text{ genotipos}}{\# \text{ muestras}} \times 100\%$$

(Ecuación 1)

### 2.6.2 Frecuencia alélica

El conjunto genético de una población puede ser determinada por medio de las frecuencias alélicas. La frecuencia alélica para un locus con dos alelos (A y a), se calcula de la siguiente manera:

$$p = f(A) \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N}$$

(Ecuación 2)

$$q = f(A) \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$

(Ecuación 3)

Donde  $n_{AA}$ ,  $n_{Aa}$  y  $2n_{aa}$  representan el número de individuos AA, Aa y aa y N el número total de individuos de la muestra. Para obtener el número de copias del

alelo, se suma el doble del número de homocigotos que el de heterocigotos y se divide por  $2N$ , ya que cada individuo tendrá en un locus dos alelos. Se debe tomar en cuenta que, la suma de las frecuencias alélicas deben ser siempre igual a 1 ( $p+q=1$ ) (Egeland et al., 2016).

### **2.6.3 Equilibrio Hardy-Weinberg**

El equilibrio Hardy-Weinberg al ser un modelo matemático nos permite estimar el efecto de la reproducción de las frecuencias alélicas y genotípicas de una población. Las frecuencias alélicas permanecerán constantes de generación en generación, siempre y cuando, una población grande se aparee de forma aleatoria y no se vea afectada por selección natural, migración o por mutaciones. Por tal motivo, el equilibrio Hardy-Weinberg determina que la reproducción no es capaz de modificar las frecuencias alélicas ni genotípicas de una población, y para calcular el equilibrio se utiliza la formula  $(p + q)^2 = 1$ , donde  $p$  es la frecuencia del alelo dominante y  $q$  es la frecuencia del recesivo (Egeland et al., 2016).

## **2.7 Pruebas no paramétricas**

### **2.7.1 Kruskal-Wallis**

La prueba de Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica, es decir, libre de distribución y se usa para comparar dos o más variables independientes de tamaños de muestras iguales o diferentes (McDonald, 2014).

### **3. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.1 Población y muestra**

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la herramienta Sample Size Calculator (Survey Software, 2012), donde se analizaron un total de 438 individuos emparentados y mayores de edad. El muestreo abarcó mestizos de la región sierra y costa, afroecuatorianos de Carchi, Esmeraldas, Guayas, Imbabura, Manabí, Napo y Pichincha, grupos indígenas Cayapas, Tsáchilas y Quechuas de las provincias de Tungurahua, Bolívar, Cañar, Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

Las muestras de saliva y sangre fueron proporcionadas por anteriores investigaciones realizadas en el laboratorio de la Dirección General de Investigación (DGI) con sus respectivos consentimientos informados.

#### **3.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos**

##### **3.2.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN a partir de hisopado bucal se realizó por el método de extracción orgánica fenol-cloroformo (Kesari, 2013). El protocolo tuvo las siguientes variantes que se describen a continuación.

Las muestras de hisopos suspendidas en buffer TNE (50mM Tris-HCL; pH: 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA), se transfirieron, tanto el hisopo como el buffer TNE a un nuevo microtubo de 1.5 mL y se agitó con vórtex por 3 minutos. El

buffer TNE se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 13000 rpm. Se retiró el buffer TNE dejando únicamente el pellet de células y se agregó 500  $\mu$ L de PBS 1x (0.137M NaCl, 0.0027M KCl, 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0018M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Se agitó con vórtex por 5 segundos y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se repitió este paso 3 veces para lavar las células. A continuación, se agregó 500  $\mu$ L de buffer de extracción (5M NaCl, 0.5M EDTA; pH: 8, 1M Tris-HCl; pH: 8, 10% SDS, H<sub>2</sub>O) y 5  $\mu$ L de proteinasa K, dejando en digestión toda la noche en el Thermomixer a 56°C. Se retiraron los tubos y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó 750  $\mu$ L de fenol-cloroformo, se agitó con vórtex y se centrifugó a 4°C por 10 minutos a máxima velocidad, se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se agitó con vórtex añadiendo 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol-isoamílico. La mezcla se centrifugó a 4°C por 10 minutos a máxima velocidad. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se agregó 50  $\mu$ L de NaCl 3M y 500  $\mu$ L de isopropanol, se agitó con vórtex y se dejó precipitando toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se centrifugó el microtubo con la solución a 4°C por 30 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70% frío, y se centrifugó a 4°C por 20 minutos a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante sin alterar el pellet y se realizó el secado del etanol en el Thermomixer a 56°C por 3 minutos. Finalmente, el pellet se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE (10mM Tris-HCl; pH: 8, 1mM EDTA; pH:8) a 37°C durante 3 horas.

La extracción de ADN a partir de sangre total se realizó por el método de extracción A-Fasano (Grijalva, 2006). El protocolo tuvo las siguientes variantes que se describen a continuación.

En un microtubo se colocó 0.5 mL de la muestra de sangre, se congeló a -80 grados C por 20 minutos, se sacó del congelador y se agregó 1 mL de agua destilada sin descongelar la muestra, y se puso en el agitador por 15 minutos, a continuación, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C se descartó el

sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet, y se resuspendió con 60  $\mu$ L de suero fisiológico, se añadió 360  $\mu$ L de A-Fasano (5M NaCl, 0.5M EDTA pH 8.0, 1M Tris pH 8.0, 10% SDS, H<sub>2</sub>O), 4  $\mu$ L de proteinasa K y se incubó a 56 °C con agitación toda la noche. Al día siguiente, se retiró de la incubadora y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se añadió 170  $\mu$ L de NaCl 5M y se mezcló suavemente, luego se añadió 600  $\mu$ L de cloroformo se mezcló por inversión (10-15 veces) y se colocó en el agitador orbital por 10 minutos, luego se centrifugó por 10 minutos a 4 °C, después se tomó la fase superior con la pipeta y se colocó en un nuevo microtubo y se añadió 600  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión (20-0 veces) hasta verificar que se formen las hebras de ADN y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó 500  $\mu$ L de etanol 70% frío y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el microtubo a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE (10mM Tris-HCl; pH: 8, 1mM EDTA; pH:8) durante 3 horas a 37 °C.

### **3.2.2 Cuantificación de ADN**

Para cada una de las muestras se cuantificó el ADN usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 UV–Vis (Thermo Scientific, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó como blanco el buffer TE, que se empleó para resuspender las muestras y se colocó 2  $\mu$ L de cada muestra para cuantificarlas.

### **3.2.3 Amplificación de los 5 polimorfismos del gen DPYD asociados a reducción de actividad enzimática**



Las muestras de ADN se amplificaron usando 5 pares de cebadores (rs39182901905, rs673767982846, rs18011591627, rs560384771236, rs180126585) (NCBI, 2008).

Las reacciones, se ensamblaron según las indicaciones de la Tabla 1, con un volumen final de 20  $\mu$ L.

Tabla 1.

*Reactivos y volúmenes empleados en la amplificación de los 5 polimorfismo del gen DPYD*

Reactivos	[Stock]	[Diluido]	[Final $\mu$ L]	Vol x 1 ( $\mu$ L)
GoTaq® Green MasterMix	2x		1x	10
Primer_Fw	100 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	1.2
Reverse_Rv	100 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	1.2
H2O				3.6
ADN			>40 ng	
				20

Se utilizó el termociclador MasterCycler® Pro (Eppendorf™, Alemania) con los programas detallado en la Tabla 2.

Tabla 2.

*Programa de amplificaciones para los 5 polimorfismos del gen DPYD.*

Etapa	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación inicial	95°C	5 min	-

Denaturación	95°C	1 min	40 ciclos
Hibridación	60°C	1 min	
Elongación	72°C	1 min	
Elongación final	72°C	5 min	
	4°C	10 min	-

### 3.2.4 Visualización de los productos de amplificación

Para visualizar los resultados, se cargó 10  $\mu$ L del producto de amplificación en un gel al 2% (2g de agarosa en 100 mL de TBE 1x) y se agregó 2  $\mu$ L de SYBR Safe.

### 3.2.5 Secuenciación

Los productos amplificados fueron purificados con el kit Agencourt® Cleanseq® (Beckman Coulter, Estados Unidos) y procesados con el kit BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems™, Estados Unidos) por el Servicio de Secuenciación de la DGI.

### 3.2.6 Análisis de Secuencias

Las secuencias se alinearon con el programa Geneious (Primer, 2005) con las configuraciones por defecto del programa. Se realizó un mapeo de referencia, donde se utilizó a los 5 polimorfismos como secuencia de referencia para todas las secuencias obtenidas.

### 3.2.7 Análisis de las proporciones de ancestría

Los análisis de ancestría fueron proporcionados por la DGI.

### **3.3 Evaluación estadística de los resultados**

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de las muestras usando las ecuaciones 1, 2 y 3, y se determinó el equilibrio en Hardy-Weinberg utilizando la fórmula descrita en el capítulo 2.

Por medio de las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis se compararon las proporciones estimadas de ancestría y se analizó la contribución independiente de la población ancestral de los alelos encontrados a través de una regresión logística. Se tomó en consideración valores  $P$  menores a 0.01 como significativos.

## **4. Resultados y Discusión**

### **4.1 Amplificación de los 5 polimorfismos del gen DPYD**

Se obtuvieron las amplificaciones de los 5 polimorfismos del gen DPYD relacionados a la reducción en la eficiencia de degradación del 5-fluorouracilo. El tamaño de los productos de amplificación de los polimorfismos; rs3918290, rs67376798, rs55886062, rs56038477, rs80081766, son de ,351 bp, 841 bp, 778 bp, 398 bp y 596 bp respectivamente.

Se analizaron un total de 438 individuos, de los cuales, 418 presentaron los 5 polimorfismos en todos los individuos. Los números (3, 18, 42, 69, 70, 267, 297,

304 y 311), (figura 1 y 2), son los códigos de las muestras de ADN pertenecientes a los individuos de diferentes etnias.

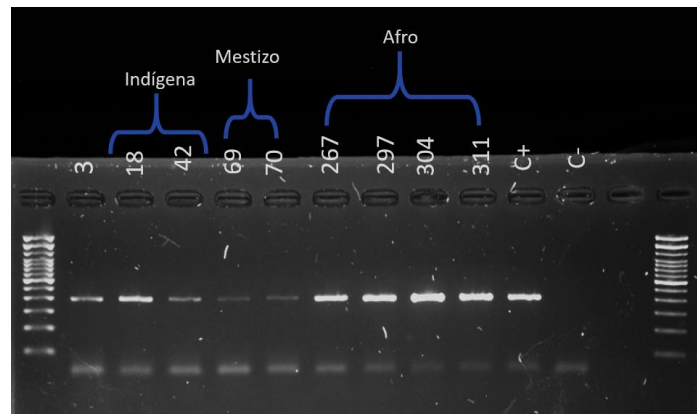


Figura 1. Electroforesis del polimorfismo rs56292912 del gen DPYD

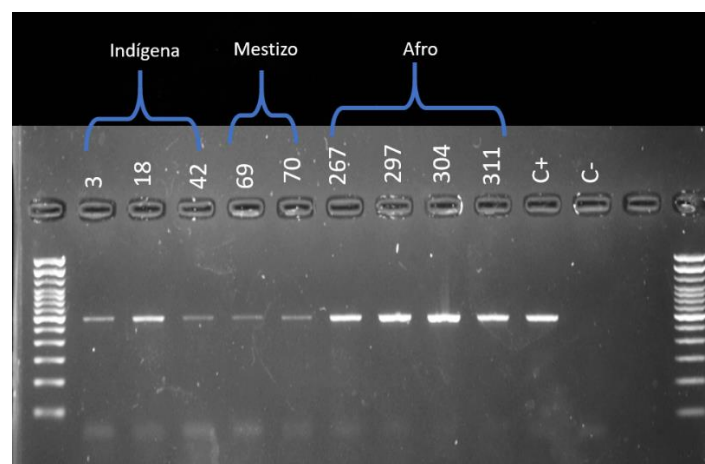


Figura 2. Electroforesis del polimorfismo rs80081766 del gen DPYD

En 20 de las 438 muestras, no se obtuvo la amplificación de los polimorfismos, esto puede deberse a varios factores, tales como inhibición de la PCR por contaminantes durante la extracción, debido a que la solubilidad del ADN se ve afectada cuando no se remueve en su totalidad el fenol-cloroformo y restos de

algunas otras sustancias presentes en la muestra (Sgaramella, 1996), y en consecuencia la contaminación de la misma. La relación 260/230 permite detectar a una absorbancia de 230 nm la presencia de fenol-cloroformo o algunos carbohidratos, donde el rango común, para descartar contaminación por dichas sustancias es de 2.0 a 2.2 (Geuther, 1977).

Se evidenció en el momento de cuantificar, la contaminación en las 20 muestras que no pudieron amplificar los polimorfismos propuestos, en la relación 260/230, estas muestras presentaban un rango menor a 2, que puede indicar contaminación por fenol-cloroformo o algunos carbohidratos.

Durante la cuantificación de las 418 muestras, se observó que aquellas que provenían de hisopo presentaban concentraciones menores de ADN en comparación a las muestras de sangre total. Esto puede deberse a que existe menor cantidad de células epiteliales en la cavidad bucal (Fanyue Sun, 2014).

#### **4.2 Análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas**

El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas se realizaron a partir de las 418 muestras secuenciadas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. y se describen a continuación.

Para el polimorfismo rs3918291 la frecuencia del genotipo homocigoto silvestre T/T es de 1. No presentó la presencia del genotipo homocigoto polimórfico C/C.

La variante rs67376798, presentó una frecuencia genotípica de 0.998 y una frecuencia alélica de 0.0013. Se observó que la frecuencia homocigota silvestre T/T es de 0.997 y presentó un polimorfismo heterocigoto T/A con frecuencia 0.003. No se observó la presencia del homocigoto polimórfico A/A.

La frecuencia del polimorfismo rs5588062, en el genotipo homocigoto silvestre A/A es de 1. No se observó la presencia del genotipo polimórfico C/C.

En la variante rs56038477 obtuvo una frecuencia genotípica de 0.965 y alélica de 0.0349. La frecuencia del genotipo homocigoto silvestre C/C fue de 0.93. No se evidenció presencia del genotipo homocigoto polimórfico T/T, sin embargo, se obtuvo el genotipo heterocigoto T/C con una frecuencia de 0.07.

La frecuencia del genotipo homocigoto silvestre T/T del polimorfismo rs80081766 fue 1. No presentó el genotipo homocigoto polimórfico C/C.

Tabla 3.

*Frecuencias genotípicas y alélicas de los 5 polimorfismos del gen DPYD.*

Población Latinoamericana	n	SNPs Frecuencias Genotípicas				
		rs3918291	rs67376798	rs55886062	rs56038477	rs80081766
	418	1	0,9987	1	0,9651	1
Población Latinoamericana	n	SNPs Frecuencias Alélicas				
		rs3918291	rs67376798	rs55886062	rs56038477	rs80081766
	418	*T=1, **C=0,00, ***T/C=0,00	*T=0,997, **A=0,003, ***T/A=0,00	*A=1, **C=0,00, ***A/C=0,00	*C=0,93, **T=0,07, ***C/T=0,00	*C=1, **T=0,00, ***C/T=0,00

\*=Homocigoto silvestre \*\*=Homocigoto polimórfico \*\*\*=Heterocigoto

La frecuencia de los 5 polimorfismos del gen DPYD están descritos en diferentes poblaciones a nivel mundial, en el cual se evidencia las frecuencias alélicas de los genotipos homocigoto silvestre y homocigoto polimórfico que se describen a continuación.

Tabla 4.

*Frecuencias Alélicas a nivel mundial.*

Población Global	n	SNPs Frecuencias Alélicas					
		rs3918291	rs67376798	rs55886062	rs56038477	rs80081766	Referencia
Europa	1006	*T=0,991, **C=0,006	*T=0,993, **A=0,007	*A=0,999, **C=0,001	*C=0,976, **T=0,024	*C=1, **T=0,00	1000Genomes
Asia	25150	*T=0,999, **C=0,003	*T=0,9999, **A=0,0004	*A=0,999, **C=0,000	*C=0,988, **T=0,012	*C=1, **T=0,00	NCBI dbSNP
África	10400	*T=1, **C=0,004	*T=0,999, **A=0,001	*A=1, **C=0,000	*C=0,997, **T=0,001	*C=1, **T=0,00	1000Genomes
Sur de Asia	978	*T=1, **C=0,00	*T=1, **A=0,00	*A=1, **C=0,000	*C=0,98, **T=0,02	N/A	1000Genomes
CentroAmérica	2448	*T=0,999, **C=0,00	*T=0,998, **A=0,002	*A=1, **C=0,000	*C=0,997, **T=0,003	*C=1, **T=0,00	gnomAD
NativoAmericano	1260	*T=0,995, **C=0,005	*T=0,996, **C=0,004	*A=0,998, **C=0,002	*C=0,986, **T=0,014	*C=1, **T=0,00	gnomAD

\*=Homocigoto silvestre \*\*=Homocigoto polimórfico N/A= No disponible

Al analizar al polimorfismo rs3918291 y compararlo con otros estudios, se puede observar que existe una diferencia notable con las distribuciones genotípicas en otras poblaciones. Según Gentile, al realizar un estudio en 156 individuos italianos, obtuvo una frecuencia de 0.987 (Gentile et al., 2016a). De acuerdo con Raida, en su estudio analizó a 1702 alemanes y la frecuencia fue de 0.0094 (Raida et al., 2001). También, en otros estudios, analizaron a 2714 holandeses, que presentaron una frecuencia de 0.0091 (Van Kuilenburg, 2004).

En la población de Asia, las frecuencias del genotipo homocigoto silvestre T/T (0.999) y homocigoto polimórfico C/C (0.003) (NCBI-SNP, 2012) tienen frecuencias similares con este estudio. Y de acuerdo con Li al analizar a 112 individuos chinos obtiene una frecuencia genotípica T/T de 1 (Li, 2016) Por lo que, la presencia del genotipo T/T puede ser más prevalente que el polimórfico C/C, y esta variante puede estar asociada a poblaciones asiáticas.

De acuerdo con los proyectos 1000Genomas y ExAc, a nivel mundial, esta variante presenta alta frecuencia en la población de Centroamérica, África y sur de Asia con valor de 1 (Genomics England, 2010). Sin embargo, hasta el momento no existen registros en población latinoamericana.

Al analizar al polimorfismo rs67376798 y compararlos con otros estudios poblacionales, tienen frecuencias similares. En el estudio realizado por Gentile de 156 muestras de población italiana, se obtuvo una frecuencia genotípica de 0.987 (Gentile et al., 2016b) y en el estudio de Hariprakash, en la población del sur de Asia se obtuvo una frecuencia de 1 (Hariprakash et al., 2018).

A nivel mundial el genotipo homocigoto silvestre T/T es más frecuente, es decir, que no existe mucha variación con el homocigoto polimórfico A/A. Y esto se evidencia en la población europea (0.991) centroamericana (0.999) y africana (1). Mientras que la frecuencia para A/A es más baja, con frecuencia de 0.006 en Europa, de 0.003 en Asia y de 0.004 en África (NCBI-SNP, 2012). Cabe mencionar que no existen registros de esta variante en población latinoamericana.

Al comparar la variante rs5588062 con el estudio de Hariprakash, en la población del sur de Asia también presenta una frecuencia de 1 (Hariprakash et al., 2018). Además, se observa que la frecuencia para el genotipo silvestre A/A de esta variante, es alta a nivel mundial, específicamente en Europa con valor de 0.999 al igual que Asia, mientras que, en África, sur de Asia y Centroamérica es de 1. Por otro lado, la frecuencia para el genotipo polimórfico C/C es baja, tan solo presenta frecuencias en Europa de 0.0001 y Nativos-americanos de 0.002 (Genomics England, 2010). Hasta la fecha no existen datos de este polimorfismo para la población latinoamericana.



El polimorfismo rs56038477 con el genotipo C/C tiene una frecuencia (0.93) similar en población europea con valor de 0.976 (gnomAD, 2009). A nivel mundial la frecuencia para el homocigoto polimórfico T/T, son bajas, en Europa presenta una frecuencia de 0.024, en Asia de 0.012, en África de 0.001, en Centroamérica de 0.003 y en nativos-americanos de 0.014 (Genomics England, 2010). Esto puede indicar que el genotipo C/C es más prevalente que el genotipo T/T a nivel mundial. Es importante destacar que no existen datos de este polimorfismo en Latinoamérica.

La variante rs80081766 tuvo la misma frecuencia (1) del genotipo silvestre T/T en poblaciones Europeas, Asiáticas, Africanas, centroamericanas y en nativos-americanos de acuerdo con los datos de 1000Genomas y ExAc, mientras que, la frecuencia para el genotipo homocigoto polimórfico C/C es de 0,000 en todas las poblaciones anteriormente mencionadas (Genomics England, 2010). Hasta el momento no se tienen registros de esta variante en Latinoamérica.

Adicional a los 5 polimorfismos propuestos en el estudio, se encontraron otras variantes que también poseen validez clínica. Las mismas se detallan en la tabla 5.

La variante rs17376848 tiene una frecuencia genotípica de 0.9557 y alélica de 0.0443, el genotipo homocigoto silvestre A/A posee una frecuencia de 0.916. No se evidenció el genotipo homocigoto polimórfico G/G. Sin embargo, se pudo observar al genotipo heterocigoto A/G con una frecuencia de 0.079.

El indel (inserción-delección) rs14105081 tiene una frecuencia genotípica de 0.9583 y alélica de 0.0417, esta variante es el cambio de T por una A.

Se encontró a la rs61622928, con una frecuencia genotípica de 0.9884 y alélica de 0.0116, esta variante no presentó ningún cambio en el genotipo homocigoto polimórfico T/T, Sin embargo, se pudo observar al genotipo heterocigoto T/C con una frecuencia de 0.023.

Otra variante que se pudo observar es a la rs1801265, esta variante no posee ningún cambio el genotipo homocigoto polimórfico G/G, pero se obtuvo a los genotipos homocigotos silvestres A/A con una frecuencia de 0.59

Las siguientes variantes presentaron los tres genotipos, homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto polimórfico que se describen a continuación;

rs1337752 se obtuvo una frecuencia genotípica de 0.2863 y alélica de 0.7137, el genotipo homocigoto silvestre C/C tiene una frecuencia de 0.142, el heterocigoto C/T con frecuencia 0.288 y el homocigoto polimórfico T/T con frecuencia 0.57.

rs1801159 su frecuencia genotípica es de 0.6922 y alélica de 0.3078, con frecuencias de 0.516 en el homocigoto silvestre T/T, 0.352 en el heterocigoto T/C y 0.13 en el homocigoto polimórfico C/C.

rs2786783 tiene una frecuencia genotípica de 0.7245 y alélica de 0.2755, las frecuencias de sus diferentes genotipos son: homocigoto silvestre G/G de 0.575, heterocigoto G/A de 0.298 y el homocigoto polimórfico A/A de 0.13.

rs2811178 posee una frecuencia genotípica de 0.3831 y alélica de 0.6169, las frecuencias de sus genotipos homocigoto silvestre T/T es de 0.258, heterocigoto T/C de 0.25 y el homocigoto polimórfico es de 0.49

Tabla 5.

*Frecuencias genotípicas y alélicas de otras variantes encontradas del gen DPYD.*

Población Latinoamericana	n = 418	SNPs Frecuencias Genotípicas							
		rs17376848	rs1337752	rs141050810	rs1801159	rs2786783	rs2811178	rs61622928	rs1801265
		0,9557	0,2863	0,9583	0,6922	0,7245	0,3831	0,9834	0,7948

Población Latinoamericana	n = 418	SNPs Frecuencias Alélicas							
		rs17376848	rs1337752	rs141050810	rs1801159	rs2786783	rs2811178	rs61622928	rs1801265
		*A=0,916 , **G=0,07 9, ***A/G=0 ,00	*C=0,14 2 **T=0,28 8, ***T/C=0 ,57	*T=0,917, **A=0,08 3	*T=0,516 , **C=0,35 2, ***T/C=0,13	*G=0,57 5, **A=0,29 8, ***G/A=0,49	*T=0,97 7, ***C=0,023, T/C=0,0 0	*C=0,97 7, **T=0,02 3, ***C/T=0,00	*A=0,59 , **G=0,4 1, ***A/G=0,00

\*=Homocigoto silvestre \*\*=Homocigoto polimórfico \*\*\*=Heterocigoto

La frecuencia de los otros polimorfismos del gen DPYD están descritos en diferentes poblaciones a nivel mundial, en el cual se evidencia las frecuencias alélicas de los genotipos homocigoto silvestre y homocigoto polimórfico que se describen a continuación.

Tabla 6.

*Frecuencias Alélicas de las otras variantes encontradas del gen DPYD a nivel mundial.*

Población Global	n	SNPs Frecuencias Alélicas								
		rs17376848	rs1337752	rs141050810	rs1801159	rs2786783	rs2811178	rs61622928	rs1801265	Referencia
Europa	1006	*A=0,963, **G=0,037	*C=0,382, **T=0,618	N/A	*T=0,785, **C=0,188	*G=0,812, **A=0,188	*T=0,382, ***C=0,618	*C=1, **T=0,00	*A=0,785, **G=0,215	1000 Genomes

<b>Asia</b>	25150	*A=0,932, **G=0,067	N/A	N/A	*T=0,851, **C=0,148	*G=0,854, **A=0,145	*T=0,314, **C=0,685	*C=0,999, **T=0,0002	*A=0,807, **G=0,192	NCBI dbS NP
<b>África</b>	10400	*A=0,977, **G=0,014	*C=0,378, **T=0,622	N/A	*T=0,846, **C=0,154	*G=0,877, **A=0,123	*T=0,374, **C=0,626	*C=0,922, **T=0,078	*A=0,558, **G=0,442	1000 Genomes
<b>Sur de Asia</b>	978	*A=0,97, **G=0,03	*C=0,39, **T=0,61	N/A	*T=0,92, **C=0,08	*G=0,92, **A=0,08	*T=0,38, **C=0,62	*C=1, **T=0,0	*A=0,73, **G=0,27	1000 Genomes
<b>CentroAmérica</b>	2448	*A=0,922, **G=0,078	N/A	N/A	*T=0,723, **C=0,277	N/A	N/A	*C=0,993, **T=0,007	*A=0,746, **G=0,254	gno mAD
<b>Nativo Americano</b>	1260	*A=0,929, **G=0,071	N/A	N/A	*T=0,744, **C=0,256	N/A	N/A	*C=0,985, **T=0,015	*A=0,74, **G=0,260	gno mAD

\*=Homocigoto silvestre \*\*=Homocigoto polimórfico N/A= No disponible

La variante rs1801159 con el genotipo C/C tiene una frecuencia similar en población europea (0.188) asiática (0.148) y africana (0.154). En otras poblaciones este genotipo C/C es un poco más alto, con una frecuencia de 0.277 en Centroamérica y 0.256 en Nativos-Americanos (gnomAD, 2009).

El polimorfismo rs2811178 con el genotipo homocigoto polimórfico C/C tiene mayor frecuencia que el homocigoto silvestre T/T, y esto se evidencia en las poblaciones asiáticas con frecuencia de 0.685 y africanas con 0.626, mientras que en estas poblaciones la frecuencia del homocigoto silvestre T/T son 0.314 y 0.374 respectivamente (NCBI-SNP, 2012).

La frecuencia del genotipo homocigoto silvestre C/C de la variante rs61622928 es similar a las de las poblaciones Nativo-americanos (0.985), y africanas (0.922). Además, se observa que la frecuencia del genotipo silvestres C/C es mayor que el genotipo polimórfico T/T en población europea y en el sur de Asia. En Europa el genotipo C/C es 1 y el T/T es de 0 al igual que en el sur de Asia (Genomics England, 2010).

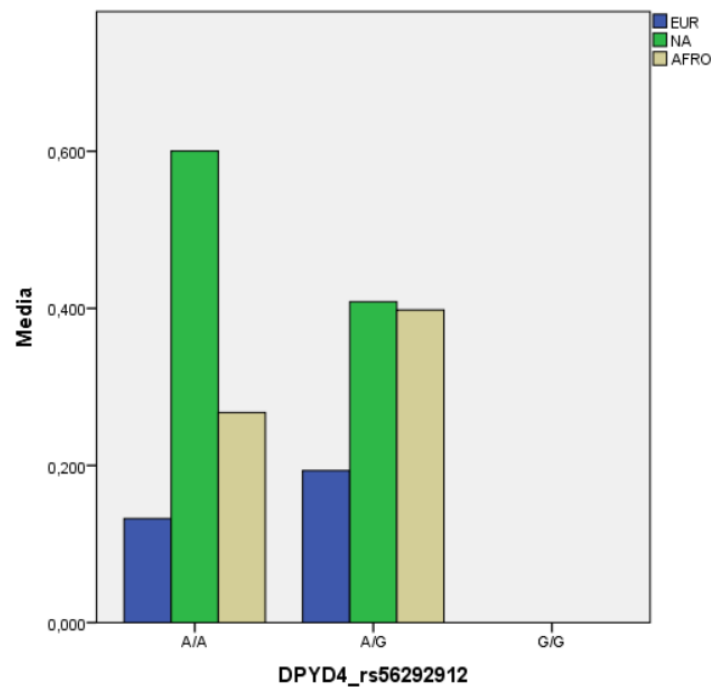
La variante rs1801265 tiene una frecuencia similar a la población africana de 0.442 en el genotipo homocigoto polimórfico G/G. Además la población con la frecuencia más alta del genotipo G/G es la asiática con valor de 0.807 (gnomAD, 2009).

Finalmente, se evidenciaron nuevos polimorfismos que no se encuentran registrados en ninguna base de datos. Los mismos están en estudio para una posible publicación, por lo que no se presentan en este trabajo.

#### **4.3 Correlación de las frecuencias genotípicas y alélicas con las proporciones de ancestría**

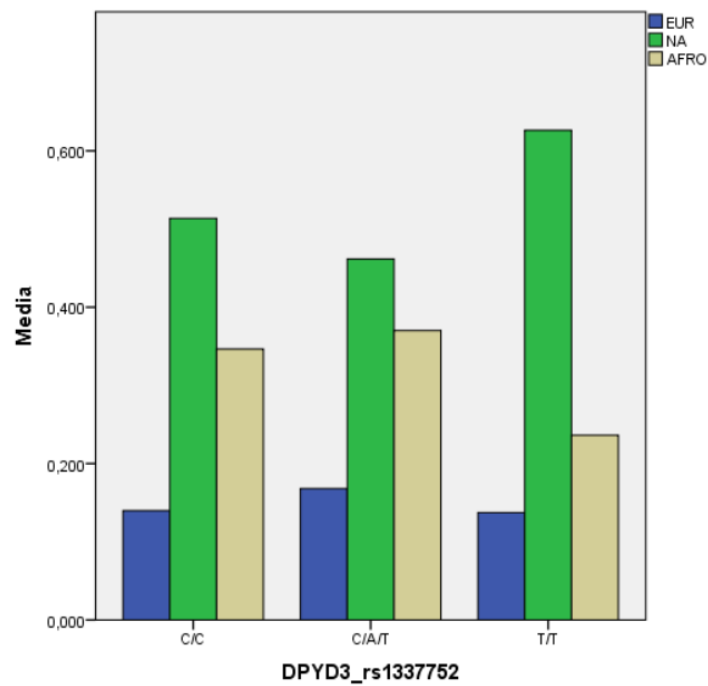
Se realizó el análisis de proporción de ancestría en las variantes rs56292912, rs17376848, rs1337752, rs141050810, rs2786783, rs2811178, rs61622928, rs1801265 que se describen a continuación. No se pudo realizar el análisis en las variantes rs3918290, rs67376798, rs55886062, rs56038477, rs80081766, porque no poseían relevancia estadística al tener un valor p mayor a 0.01.

En la variante rs56292912 se puede observar que el genotipo A/A se encuentra en mayor proporción en la población nativo-americana, y el genotipo heterocigoto A/G tienen aproximadamente la misma proporción en la población nativo-americana y la afrodescendiente. No se evidenció el genotipo polimórfico G/G en ninguna de las poblaciones.



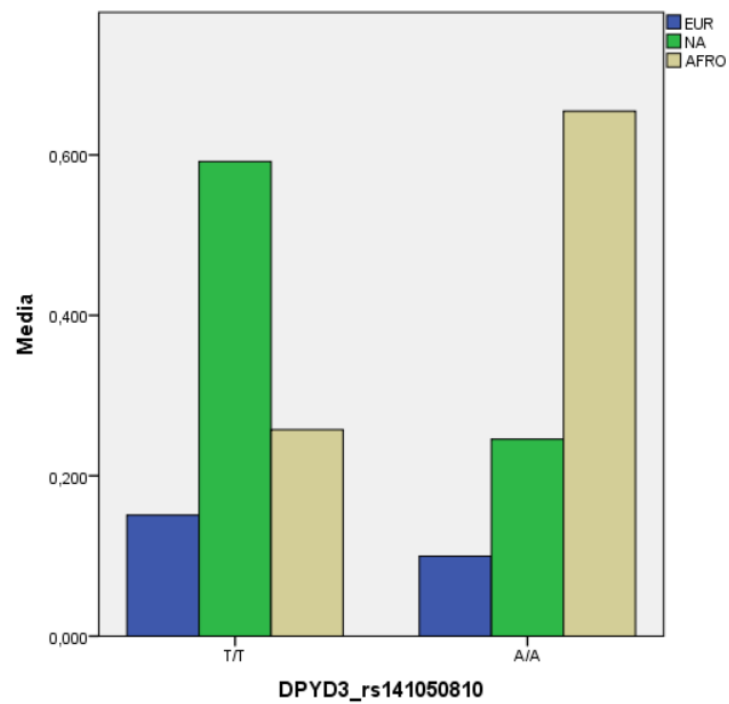
*Figura 3.* Correlación de la variante rs56292912 con las proporciones de ancestría

Para la variante rs1337752 se puede observar (figura 4) que el genotipo polimórfico T/T, tiene mayor proporción con la población nativa americana, mientras que, en menor proporción los genotipos C/C y C/A/T con la población afrodescendiente y haciendo una comparación según el NCBI-SNP las frecuencias de los genotipos C/C y T/T son más altos en la población europea y en el sur de Asia (NCBI-SNP, 2012).



*Figura 4.* Correlación de la variante rs1337752 con las proporciones de ancestría

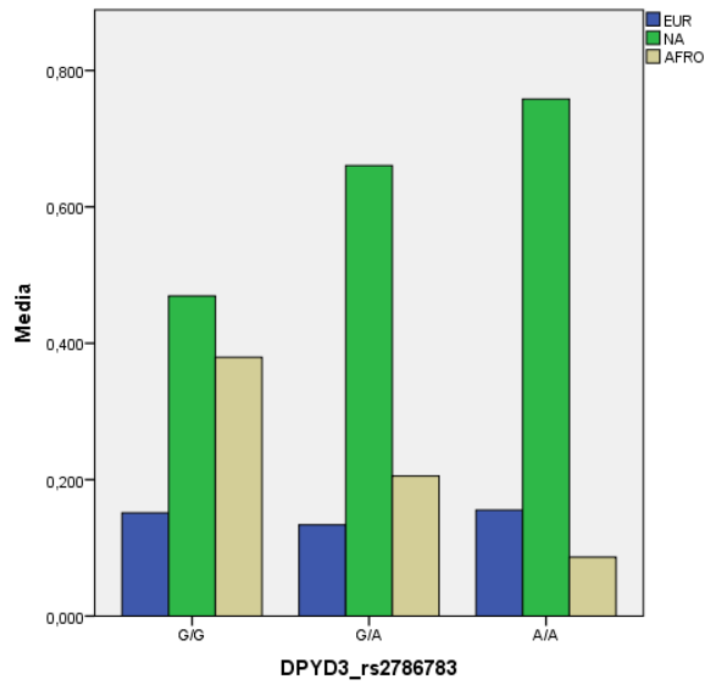
La variante indel rs141050810 A/A está presente en mayor proporción en la población afrodescendiente, y el genotipo silvestre T/T en la población nativo-americana, como se observa en la figura 5. Hasta donde se tiene conocimiento, no existe un registro de esta variante en ninguna base de datos para las diferentes poblaciones a nivel mundial.



*Figura 5.* Correlación de la variante rs141050810 con las proporciones de ancestría

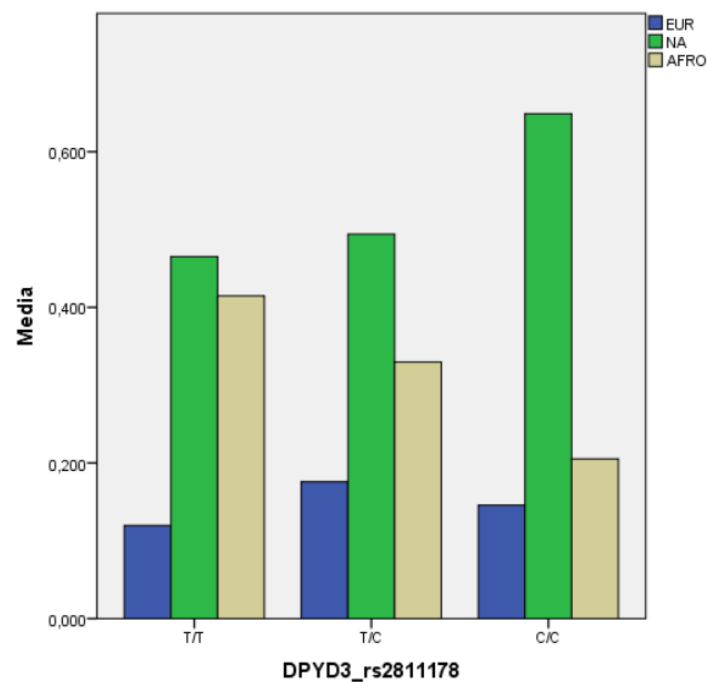
De acuerdo con la figura 6 el genotipo polimórfico A/A de rs2786783 presenta mayor proporción en la población nativo-americana, mientras que, el genotipo silvestre G/G es más frecuente en la población afrodescendiente.





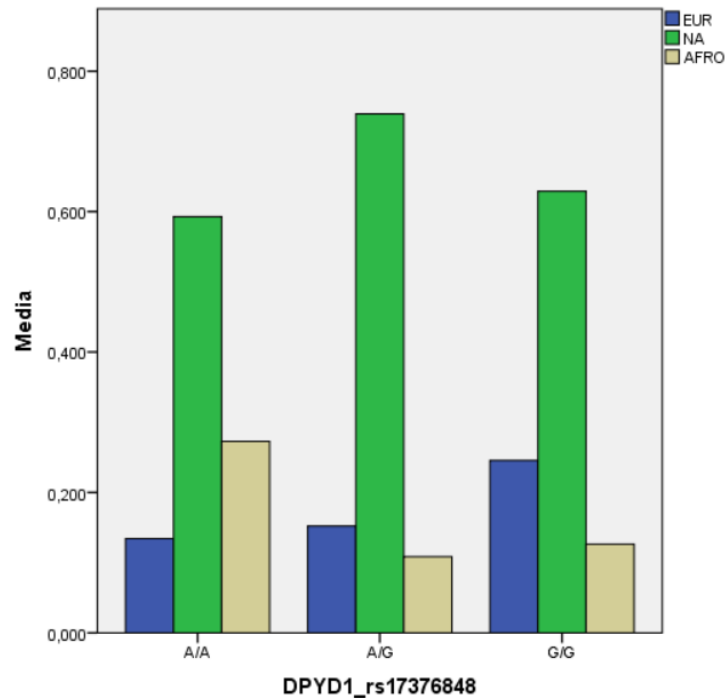
*Figura 6.* Correlación de la variante rs2786783 con las proporciones de ancestría

En la figura 7, el genotipo C/C de la variante rs2811178 tiene mayor proporción en la población nativo-americana. Por otra parte, el genotipo T/T presenta proporciones casi similares tanto en la población nativo-americana como en la afrodescendiente.



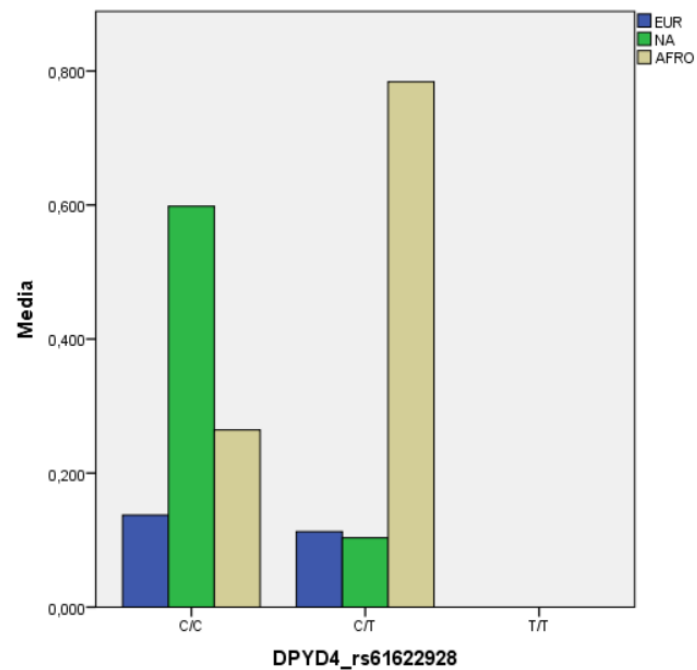
*Figura 7.* Correlación de la variante rs2811178 con las proporciones de ancestría

Se puede observar (figura 3) que la variante rs17376848 con el genotipo A/G se encuentra en mayor proporción en la población nativa americano, seguido del genotipo A/A y G/G. De acuerdo a 1000genome y ExAc las frecuencias de los genotipos A/A y G/G se encuentran mayormente en las poblaciones europeas y africanas (Genomics England, 2010). Sin embargo, no se ha evidenciado registros para el genotipo heterocigoto A/G para ninguna población.



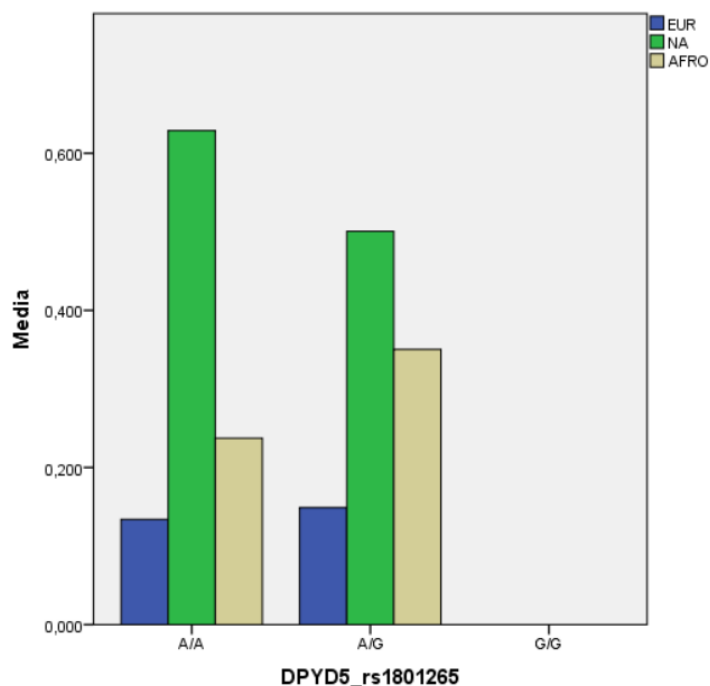
*Figura 8.* Correlación de la variante rs17376848 con las proporciones de ancestría

El genotipo C/T de la variante rs61622928 (figura 9) tiene mayor proporción en la población afrodescendiente, mientras que el genotipo C/C posee mayor proporción en la población nativo-americana. No se presencié el genotipo T/T en el estudio.



*Figura 9.* Correlación de la variante rs61622928 con las proporciones de ancestría

En la variante rs1801265 se puede observar (figura 10) que el genotipo A/A posee mayor proporción en la población nativo-americana en comparación con el genotipo A/G. De igual manera, el genotipo A/G está presente con menor proporción en la población afrodescendiente. No se presencié el genotipo G/G en la población de estudio.



*Figura 10.* Correlación de la variante rs1801265 con las proporciones de ancestría

No hay estudios que demuestren una correlación de los polimorfismos del gen DPYD con la ancestría en las poblaciones. Sin embargo, según la guía del Consorcio de Implementación de Farmacogenética clínica, en algunas de las variantes estudiadas (rs75017182, rs67376798, rs11523298), los genotipos silvestres son más frecuentes en poblaciones europeas y afrodescendientes (Amstutz et al., 2018), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Adicionalmente, los datos de Offer sobre la variante rs56292912, señalan que el genotipo silvestre es más frecuente en población europea (Offer et al., 2014) lo que se presenta también en los datos obtenidos en población ecuatoriana. Los dos trabajos de investigación mencionados que tienen resultados similares con nuestro estudio nos permiten presumir que los polimorfismos descritos tienen una estrecha relación con ancestría europea.

Por el contrario, no existe información acerca de la ancestría bibliográfica de las variantes rs17376848 A/G, rs1337752 T/T, rs2786783 A/A, rs2811178 C/C,

rs56292912 A/A, rs1801265 A/A, por lo que, con los resultados obtenidos en este estudio, se presume que estos polimorfismos pueden presentarse en individuos que tengan descendencia nativo-americana, mientras que las variantes rs140050810 A/A y rs6122928 C/T, pueden estar presentes en individuos afrodescendientes.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Las frecuencias obtenidas del polimorfismo rs3918291 son similares a las de población asiática, así como también la variante rs80081766 que tiene la misma frecuencia en poblaciones europeas, asiáticas, africanas y nativas americanas.

La frecuencia del genotipo homocigoto silvestre T/T de la variante rs67376798 es mayor que la del homocigoto polimórfico A/A, igual que en las poblaciones europeas y africanas. También, en la variante rs5588062 es más frecuente el genotipo silvestre A/A que su genotipo polimórfico C/C con el mismo comportamiento en poblaciones europeas y nativo-americanas. Sucede lo mismo con la variante rs56038477, cuyo genotipo silvestre C/C es más frecuente que su genotipo polimórfico T/T igual que en poblaciones europeas, asiáticas y africanas.

La correlación de las frecuencias con la proporción de ancestría permite identificar qué variantes del gen DPYD pueden asociarse con las diferentes poblaciones a nivel mundial.

Las variantes rs17376848 A/G, rs1337752 T/T, rs2786783 A/A, rs2811178 C/C, rs56292912 A/A, rs1801265 A/A, pueden estar presentes en individuos que tengan descendencia nativo-americana. Por otra parte, las variantes rs140050810 A/A y rs6122928 C/T se relacionan con individuos afrodescendientes.

## **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda incrementar el número de muestras de la población para aumentar la significancia estadística del estudio.

Se sugiere comparar los resultados obtenidos con estudios clínicos que analicen, el comportamiento de la enzima en individuos que se administren 5-FU.



## REFERENCIAS

- American Cancer Society. (2014). *Evolution of Cancer Treatments: Chemotherapy* | American Cancer Society. Recuperado el 14 de Abril de 2019, de <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/cancer-treatment-chemo.html>
- Amstutz, U., Henricks, L. M., Offer, S. M., Barbarino, J., Schellens, J. H. M., Swen, J. J., Schwab, M. (2018). *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 103(2), 210–216. <https://doi.org/10.1002/cpt.911>
- Anampa, J., Makower, D., & Sparano, J. A. (2015). *Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview*. *BMC Medicine*, 13(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>
- Arizaga Eduardo, Báez Oswaldo, Cruz Marcelo, N. B. (2015). Historia de las Ciencias en el Ecuador (YACHAY E., pp. 27–44). Quito. Recuperado el 23 de Octubre de 2019, de [https://www.researchgate.net/publication/287201628\\_La\\_Historia\\_del\\_Ecuador\\_contada\\_por\\_los\\_genes](https://www.researchgate.net/publication/287201628_La_Historia_del_Ecuador_contada_por_los_genes)
- Aronson, J. . (2016). *Nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)*. *Meyler's Side Effects of Drugs*, 280–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01173-2>
- Campbell, J. M., Bateman, E., Peters, M. D., Bowen, J. M., Keefe, D. M., & Stephenson, M. D. (2016). *Fluoropyrimidine and platinum toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses*. *Pharmacogenomics*, 17(4), 435–451. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.180>
- Cannon, G. M., Adelstein, D. J., Gentry, L. R., & Harari, P. M. (2016). *Oropharyngeal Cancer*. *Clinical Radiation Oncology*, 597-628.e6.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24098-7.00033-2>

Chun, R. (2009). *Cancer Chemotherapy. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1016/B978-072160558-6.50014-9>

Cueva, P., & Yépez, J. (2014). CANCER EPIDEMIOLOGY IN QUITO SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER SOLCA NÚCLEO DE QUITO REGISTRO NACIONAL DE TUMORES / NATIONAL CANCER REGISTRY. Recuperado el 23 de de 2019, de <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/PUBLICACION-QU-2006-2010.pdf>

Dean, L. (2012). Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype. *Medical Genetics Summaries. National Center for Biotechnology Information (US)*. Recuperado el 7 de Enero de 2020, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520376>

Deenen, M. J., Meulendijks, D., Cats, A., Sechterberger, M. K., Severens, J. L., Boot, H., ... Schellens, J. H. M. (2016). *Upfront Genotyping of DPYD \*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. Journal of Clinical Oncology*, 34(3), 227–234. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.1325>

Devisetty, K., & Wong, S. J. (2013). *Neoadjuvant Versus Induction Chemotherapy: More Than Semantics. Journal of Clinical Oncology*, 31(23), 2971–2972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.2674>

DeVita, V. T., & Chu, E. (2018). *Cancer Research. Cancer Res.*, 43(12\_Part\_1), 6106–6108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6611>

Diasio, R. B., & Harris, B. E. (1989). *Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clinical Pharmacokinetics*, 16(4), 215–237. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>

Drusano, G. L. (2017). *Combination Chemotherapy With Anti-Infective Agents. Individualized Drug Therapy for Patients*, 181–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803348-7.00013-7>

- Egeland, T., Kling, D., & Mostad, P. (2016). *Parameter estimation and uncertainty. Relationship Inference with Familias and R*, 189–202. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802402-7.00007-2>
- Engelking, L. R., & Engelking, L. R. (2015). *Pyrimidine Biosynthesis. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 83–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50014-1>
- Fanyue Sun, E. J. R. (2014). *Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: Review of current methods and applications*. Recuperado el 7 de Enero de 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/263742867\\_Saliva\\_as\\_a\\_source\\_of\\_genomic\\_DNA\\_for\\_genetic\\_studies\\_Review\\_of\\_current\\_methods\\_and\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/263742867_Saliva_as_a_source_of_genomic_DNA_for_genetic_studies_Review_of_current_methods_and_applications)
- Fischer, D. S., Henry, J., Knobf, M. T., Beaulieu, N., Lippincott, B., & Publishers, W. (2018). *Lippincott 's Cancer Chemotherapy Handbook. Cancer Chemotherapy Handbook*, (January), 1–295.
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., ... Albini, A. (2015). *Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. PLOS ONE*, 10(2), e0115686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115686>
- Frangou, E. A., Bertias, G., & Boumpas, D. T. (2016). *Cytotoxic-Immunosuppressive Drug Treatment. In Systemic Lupus Erythematosus (pp. 533–541). Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801917-7.00062-0>
- GeneCards. (2018). *GeneCards*. <https://doi.org/10.1093/DATABASE>
- Genomics England. (2010). *The 100,000 Genomes Project | Genomics England*. Recuperado el 7 de Enero de 2020, de <https://www.genomicsengland.co.uk/about-genomics-england/the-100000-genomes-project/>
- Gentile, G., Botticelli, A., Lionetto, L., Mazzuca, F., Simmaco, M., Marchetti, P.,

- & Borro, M. (2016a). *Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. The Pharmacogenomics Journal*, 16(4), 320–325. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.56>
- Gentile, G., Botticelli, A., Lionetto, L., Mazzuca, F., Simmaco, M., Marchetti, P., & Borro, M. (2016b). *Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: A candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. Pharmacogenomics Journal*, 16(4), 320–325. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.56>
- Geuther, R. (1977). A. L. LEHNINGER, Biochemistry. *The Molecular Basis of Cell Structure and Function (2nd Edition)*. 1104 S., zahlr. Abb., zahlr. Tab. New York 1975. Worth Publ. Inc. \$ 17.50. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 17(1), 86–87. <https://doi.org/10.1002/jobm.3630170116>
- gnomAD. (2009). *gnomAD*. Recuperado el 7 de Enero de 2020, de <https://gnomad.broadinstitute.org/>
- Grijalva, D. M. (2006). Extracción manual de ADN genómico a partir de Sangre Total.
- HADDOW, A., KON, G. A. R., & ROSS, W. C. J. (2014). *Effects upon tumours of Various Haloalkylarylamines. Nature*, 162(4125), 824–825. <https://doi.org/10.1038/162824a0>
- Hariprakash, J. M., Vellarikkal, S. K., Keechilat, P., Verma, A., Jayarajan, R., Dixit, V., ... Scaria, V. (2018). *Pharmacogenetic landscape of DPYD variants in south Asian populations by integration of genome-scale data. Pharmacogenomics*, 19(3), 227–241. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0101>
- Henricks, L. M., Opdam, F. L., Beijnen, J. H., Cats, A., & Schellens, J. H. M. (2017). *DPYD genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: Call for a drug label update. Annals of Oncology*, 28(12), 2915–2922. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx411>

- Henricks, Linda M, Lunenburg, C. A., Meulendijks, D., Gelderblom, H., Cats, A., Swen, J. J., ... Guchelaar, H.-J. (2015). *Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score. Pharmacogenomics, 16(11), 1275–1284.* <https://doi.org/10.2217/pgs.15.70>
- Kesari, A., Dalal, A., Lal, G., & Pandey, S. N. (2013). *Molecular diagnostics. BioMed Research International (Vol. 2013).* <https://doi.org/10.1155/2013/387486>
- Kim, K.-W., Roh, J. K., Wee, H.-J., & Kim, C. (2016). *Cancer drug discovery: science and history. Springer.*
- Kozyra, M., Ingelman-Sundberg, M., & Lauschke, V. M. (2017). *Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. Genetics in Medicine, 19(1), 20–29.* <https://doi.org/10.1038/gim.2016.33>
- Larriva, M., Foxhall, L. E., Rodriguez, M. A., Youn, Y.-K., Lee, K. E., Choi, J. Y., ... The, W. A. (2013). *P H Y S I C I a N S ' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2 0 1 8. European Journal of Cancer Care (Vol. 16).* Recuperado Enero 7, 2020 de [www.jblearning.com/medicine/oncology](http://www.jblearning.com/medicine/oncology).
- Li, G.-Y., Duan, J.-F., Li, W.-J., & Liu, T. (2016). *DPYD\*2A/\*5A/\*9A and UGT1A1\*6/\*28 polymorphisms in Chinese colorectal cancer patients. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 12(2), 782.* <https://doi.org/10.4103/0973-1482.148685>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). *5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer, 3(5), 330–338.* <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- LOVD, G. V. shared. (2004). *Full data view for gene DPYD - Global Variome shared LOVD.* Recuperado el 23 de Octubre de 2019, de <https://databases.lovd.nl/shared/view/DPYD>
- Lunenburg, C. A. T. C., Henricks, L. M., Dreussi, E., Peters, F. P., Fiocco, M.,

- Meulendijks, D., ... Gelderblom, H. (2018). *Standard fluoropyrimidine dosages in chemoradiation therapy result in an increased risk of severe toxicity in DPYD variant allele carriers. European Journal of Cancer.* <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.138>
- Matáková, T., Halašová, E., Škovierová, H., Dzian, A., Dobrota, D., & Škereňová, M. (2017). *DPYD genotype and haplotype analysis and colorectal cancer susceptibility in a case-control study from Slovakia. General Physiology and Biophysics, 36(05), 557–563.* [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2017046](https://doi.org/10.4149/gpb_2017046)
- Matsusaka, S., & Lenz, H. J. (2015). *Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 11(5), 811–821.* <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1027684>
- Matus-Santos et al. (2015). Revisión del monitoreo farmacocinético del 5-fluorouracilo como herramienta para incrementar eficacia y seguridad. Distrito Federal México. Recuperado el 23 de Octubre de 2019 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im163n.pdf>
- McDonald, J. H. (2014). *Kruskal–Wallis test - Handbook of Biological Statistics.* Recuperado el 23 de Octubre de 2019, de <http://www.biostathandbook.com/kruskalwallis.html>
- Meulendijks, D., Henricks, L. M., Sonke, G. S., Deenen, M. J., Froehlich, T. K., Amstutz, U., ... Schellens, J. H. M. (2015). *Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. The Lancet Oncology, 16(16), 1639–1650.* [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00286-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00286-7)
- Nacional De Salud, C. (2013). REPUBLICA DEL ECUADOR MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Recuperado el 23 de Octubre de 2020 de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21672es/s21672es.pdf>
- NCBI-SNP. (2012). *Home - SNP - NCBI.* Recuperado el 7 de Enero de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

- NCBI. (2008). *DPYD dihydropyrimidine dehydrogenase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1806>
- Nies, A. T., Magdy, T., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2015). *Role of ABC Transporters in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy Response (pp. 217–243)*. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.10.007>
- NIH. (2011). *DPYD gene - Genetics Home Reference - NIH*. Recuperado Octubre 23, 2019 de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DPYD#normalfunction>
- O'Donnell, P. H., & Dolan, M. E. (2009). *Cancer Pharmacogenetics: Ethnic Differences in Susceptibility to the Effects of Chemotherapy. Clinical Cancer Research, 15(15), 4806–4814*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0344>
- Offer, S. M., Fossum, C. C., Wegner, N. J., Stuflesser, A. J., Butterfield, G. L., & Diasio, R. B. (2014). *Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. Cancer Research, 74(9), 2545–2554*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2482>
- Oh, H. H., Surapaneni, S., & Hui, J. Y. (2013). *Preclinical Development of Oncology Drugs. A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development, 543–565*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00023-X>
- Organization, W. H. (2015). *WHO Model List of Essential Medicines 19th List (April 2015)*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2019 de <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
- Papadimitraki, E. D., & Boumpas, D. T. (2007). *Chapter 46 – Cytotoxic Drug Treatment. In Systemic Lupus Erythematosus (pp. 498–510)*. Mosby. Recuperado el 22 de Noviembre de 2019 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323044349500579>
- Pratt, V., Mcleod, H., Rubinstein, W., Dean, L., Kattman, B., & Malheiro, A.

(2017). *Medical Genetics Summaries*.

Primer, G. (2005). *Geneious | Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis*. Recuperado Noviembre 22, 2019 de <https://www.geneious.com/>

Raida, M., Schwabe, W., Häusler, P., Van Kuilenburg, A. B. P., Van Gennip, A. H., Behnke, D., & Höffken, K. (2001). *Prevalence of a Common Point Mutation in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Gene within the 5-Splice Donor Site of Intron 14 in Patients with Severe 5-Fluorouracil (5-FU)-related Toxicity Compared with Controls 1*.

Re, M. Del, Restante, G., Di Paolo, A., Crucitta, S., Rofi, E., & Danesi, R. (2017a). *Pharmacogenetics and Metabolism from Science to Implementation in Clinical Practice: The Example of Dihydropyrimidine Dehydrogenase*. *Current Pharmaceutical Design*, 23(14). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170125155530>

Re, M. Del, Restante, G., Di Paolo, A., Crucitta, S., Rofi, E., & Danesi, R. (2017b). *Pharmacogenetics and Metabolism from Science to Implementation in Clinical Practice: The Example of Dihydropyrimidine Dehydrogenase*. *Current Pharmaceutical Design*, 23(14). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170125155530>

Rustum, Y. M. (2003). *Fluoropyrimidines in cancer therapy*. Humana Press.

Sgaramella, V. (1996). *YAC protocols. Methods in molecular biology, vol. 54*. *FEBS Letters*, 398(2–3), 338–338. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(97\)81273-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(97)81273-2)

Shrestha, S., Zhang, C., Jerde, C. R., Nie, Q., Li, H., Offer, S. M., & Diasio, R. B. (2018). *Gene-Specific Variant Classifier (DPYD-Varifier) to Identify Deleterious Alleles of Dihydropyrimidine Dehydrogenase*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 104(4), 709–718. <https://doi.org/10.1002/cpt.1020>

SOLCA Quito. (2017). Hospital Oncológico Solca Núcleo de Quito - Cáncer en Quito 2010 - 2013. Recuperado el 23 de Enero de 2019, de



<http://www.solcaquito.org.ec/index.php/publicaciones/epidemiologia/cancer-en-quito-2010-2013>

- Surapaneni, S., & Hui, J. Y. (2017). *Preclinical Development of Oncology Drugs. In A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (pp. 685–707). Elsevier.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00026-8>
- Survey Software - The Survey System. (2012). *Sample Size Calculator - Confidence Level, Confidence Interval, Sample Size, Population Size, Relevant Population - Creative Research Systems.* Recuperado el 7 de Enero de 2020, de <https://www.surveysystem.com/sscalc.htm>
- Szucs, Z., & Jones, R. L. (2016). *Introduction to Systemic Antineoplastic Treatments for Cardiologists. Clinical Cardio-Oncology, 15–38.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44227-5.00002-8>
- Thirumaran, R., & Gilman, P. B. (2007). *Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer. Cancer Immunotherapy, 101–116.* <https://doi.org/10.1016/B978-012372551-6/50071-7>
- Van Kuilenburg, A. B. P. (2004). *Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. European Journal of Cancer, 40(7), 939–950.* <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.12.004>
- Wigle, T. J., Tsvetkova, E. V., Welch, S. A., & Kim, R. B. (2019). *DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. Pharmaceutics, 11(5), 199.* <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050199>
- Yen, J. L., & McLeod, H. L. (2007). *Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? European Journal of Cancer, 43(6), 1011–1016.* <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.01.030>

