

Paula Sanchón Sánchez<sup>1</sup>, Eric S. Yamanaka<sup>1,2</sup>, Luis A. Tortajada-Genaro<sup>1,2</sup>, Ángel Maquieira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universitat Politècnica de València. Camino de vera s/n, 46022 Valencia

<sup>2</sup> Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)

Universitat Politècnica de València-Universitat de València. Camino de vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: pausans1@etsiamn.upv.es

**Farmacología**

-Farmacodinámica  
-Farmacocinética

absorción  
distribución  
metabolismo  
eliminación

+

**Genética**

Genes → Enzimas  
(mecanismo de acción y metabolismo)

=

**Farmacogenética**

Determinación dosis terapéutica → fármacos relacionados con **enfermedades cardiovasculares y trombosis.**

Los anticoagulantes orales de la familia de las cumarinas **más empleados** son la **warfarina** y el **acenocumarol**, antagonistas de la vitamina K. Sin embargo, presentan amplia variedad interindividual en la dosis terapéutica.

Factores que influyen en la determinación de la dosis (Adaptada de Baker y Johnson, 2016).

**Problemática actual:** Ausencia de información genética en la determinación del tratamiento.

**Solución:** Desarrollo de métodos que permitan obtener información genética, del SNP rs9923231 localizado en el gen **VKORC1**, para la administración personalizada del fármaco anticoagulante.

**ESTRATEGIAS DE GENOTIPADO**

- Amplificación alelo específica: PCR-ASA
- Ligación alelo específica + amplificación universal

- ✓ Rápidas
- ✓ Eficaces
- ✓ Sencillas
- ✓ Económicas

## MÉTODOS NO INVASIVOS DE RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Epitelio bucal      Cabello

**PCR tras extracción de ADN genómico.**

*ACTB*, gen humano beta actina, utilizado como control endógeno.

Influencia del tejido de procedencia en el ADN extraído: No diferencias estadísticamente significativas ( $t = -1,66$  y  $\text{valor-P} = 0,1$ ) entre el ADN extraído de ambos tejidos.

## PCR-ASA

**Cebadores alelo específico convencionales:**

**Cebadores alelo específico ARMS:**

(\*): penúltimo nucleótido (A) en extremo 3' no complementario con la hebra molde.

**Capacidad discriminante de ambos tipos de cebadores:**

Con los convencionales no se pudo discriminar el genotipo. Con los cebadores ARMS, el homocigoto nativo ( $t = 11,43$  y  $\text{valor-P} = 3 \cdot 10^{-4}$ ) y el homocigoto mutante ( $t = -6,74$  y  $\text{valor-P} = 0,002$ ), presentaron diferencias estadísticamente significativas, permitiendo discernir a qué subgrupo pertenece cada individuo. Por otra parte, el genotipo heterocigoto ( $t = 2,78$  y  $\text{valor-P} = 0,05$ ) no presentó diferencias.

- Individuo con genotipo homocigoto nativo.
- Individuo con genotipo heterocigoto
- Individuo con genotipo homocigoto mutante
- Control negativo de amplificación

## SECUENCIACIÓN SANGER como técnica de referencia

Homocigoto nativo

Heterocigoto

Homocigoto mutante

## LIGACIÓN ALELO ESPECÍFICA Y AMPLIFICACIÓN UNIVERSAL

**Ensayos preliminares:** Se generaron controles negativos y positivos (para las dos mezclas de reacción: nativa y mutante), de las dos etapas del ensayo.

Muestra	Fluorescencia		Análisis estadístico	Banda		Electroforesis Intensidad neta	
	NTC	Control		NTC	Control	NTC	Control
Control de amplificación nativo	2637±316	5591±671	$t = 5,39$ $\text{valor-P} = 0,006$	No	Sí	0	10220
Control de amplificación mutante	1642±88	8715±462	$t = 21,25$ $\text{valor-P} = 0,002$	No	Sí	0	11851

  

Muestra	Fluorescencia		Análisis estadístico	Banda		Electroforesis Intensidad neta	
	NTC	Control		NTC	Control	NTC	Control
Control de ligación negativo	1346±202	1946±291	$t = 2,94$ $\text{valor-P} = 0,04$	No	No	0	0
Control de ligación positivo nativo	1346±202	4204±631	$t = 7,47$ $\text{valor-P} = 0,002$	No	Sí	0	2570
Control de ligación positivo mutante	1342±202	5408±822	$t = 8,31$ $\text{valor-P} = 0,001$	No	Sí	0	3856