

**Validación de un kit comercial
(diagnóstico del síndrome de Gilbert)
para la determinación del
polimorfismo UGT1A1*28 (intolerancia
al irinotecán): evaluación de su
implementación en la práctica
asistencial**

Trabajo de fin de Grado

Departamento de Bioquímica

María Mayoral Pallarés

Curso 2021/22

Tutor: Dra. Silvia Izquierdo Álvarez

Ponente: Nuria Garrido Pérez

ABSTRACT

Irinotecan is a drug used in first-line metastatic colorectal cancer (usually in combination with fluorouracil). The FDA included in 2017 as a prognostic genomic biomarker of toxicity variants in the UGT1A1 gene. Patients heterozygous carriers of the UGT1A1*1/*28 allele and homozygous carriers of the UGT1A1*1/*28/28 allele show reduced activity of the enzyme. For this reason, the determination of the UGT1A1 family variants is recommended in patients being treated with irinotecan. There is an association between patients with the UGT1A1*28 allele and decreased UGT1A1 expression and, consequently, decreased SN-38 glucuronidation. Decreased UGT1A1 is associated with elevated (approximately 4-fold) risk of severe irinotecan toxicity, including diarrhea and neutropenia.

Hence, the need to implement the use of a commercial kit for use in clinical practice, guaranteeing the veracity of the results. For this purpose, a validation-verification of a commercial kit initially intended for the diagnosis of Gilbert's Syndrome has been carried out for its application in the genetic study of the UGT1A1*28 polymorphism: intolerance to irinotecan and its metabolites. Likewise, the results of the implementation of the use of this kit in healthcare practice and the frequency of the polymorphism in heterozygosis and homozygosis in the study population during a period of about 4 months since its use for diagnosis in patient samples have been statistically evaluated.

The results obtained in this TFG had a 100% concordance (intra and inter-laboratory) and allow us to ensure that the EXPERTEAM Kit is validated and verified and can be used for the study of the presence of the A(TA)_nTAA polymorphism in the *UGT1A1* gene. Furthermore, of the 79 patients who made up the study, it was concluded that 18% presented the polymorphism heterozygous, 37% homozygous, and 45% were normal.

RESUMEN

El irinotecán es un medicamento utilizado en primera línea del cáncer colorrectal metastásico (habitualmente en combinación con fluorouracilo). La FDA incluyó en el año 2017 como biomarcador genómico pronóstico de toxicidad las variantes en el gen *UGT1A1*. Los pacientes portadores en heterocigosis del alelo *UGT1A1*1/*28* y en homocigosis *UGT1A1*28/28* presentan una actividad reducida de la enzima. Es por ello que se recomienda la determinación de las variantes de la familia *UGT1A1* en pacientes en tratamiento con irinotecán. Existe asociación entre pacientes con el alelo *UGT1A1*28* y disminución de la expresión de *UGT1A1* y, en consecuencia, disminución de la glucuronidación de SN-38. La disminución de *UGT1A1* se asocia con riesgo elevado (aproximadamente 4 veces) de toxicidad severa con irinotecán, incluyendo diarrea y neutropenia.

De ahí la necesidad de implementar la utilización de un kit comercial para su uso en la práctica clínica asistencial garantizando la veracidad de los resultados. Para ello, se ha realizado una validación-verificación de un kit comercial inicialmente destinado para el diagnóstico de Síndrome de Gilbert para su aplicación en el estudio genético del polimorfismo *UGT1A1*28*: intolerancia al irinotecán y sus metabolitos. Asimismo, se han evaluado estadísticamente los resultados de la implementación del uso de dicho kit en la práctica asistencial y la frecuencia del polimorfismo en heterocigosis y homocigosis en la población a estudio durante un periodo de unos 4 meses desde su uso para diagnóstico en muestras de pacientes.

Los resultados obtenidos han tenido una concordancia del 100% (intra e inter-laboratorio) y permiten asegurar que el Kit EXPERTEAM está validado y verificado y puede emplearse para el estudio de la presencia del polimorfismo A(TA)₇TAA en el gen *UGT1A1*. Además, de los 79 pacientes que han conformado el estudio, se ha concluido que el 18% presentan el polimorfismo heterocigoto, el 37% homocigotos, y el 45% eran normales.

GLOSARIO/ABREVIATURAS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **Alelo normal:** el asociado al fenotipo normal es el más común en la población. El opuesto al alelo mutante. También se le denomina **alelo salvaje** o **silvestre (wild type)**
- **Alelo:** cada una de las versiones alternativas de un gen en un locus determinado. Los diferentes alelos producen variaciones en los rasgos heredados, por ejemplo, el color de los ojos o los grupos sanguíneos. Cada individuo tiene dos alelos de cada gen, un alelo heredado del padre y el otro de la madre.
- **ENAC:** Entidad Nacional de Acreditación.
- **FDA:** Food and Drug Administration.
- **Gen:** unidad básica de la herencia que consiste en un segmento de ADN que codifica una proteína específica o un segmento de una proteína (o una molécula de ARN) con una característica o función determinadas.
- **Genotipo:** constitución genética de un organismo o célula; se refiere también al grupo específico de alelos heredados en un locus.
- **Heterocigoto:** individuo que tiene 2 alelos diferentes en un locus, uno en cada cromosoma.
- **Homocigoto:** individuo que tiene 2 alelos idénticos en un mismo locus determinado, uno en cada cromosoma.
- **Locus:** lugar o localización física de un gen específico en un cromosoma.
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

Índice general

1.	Introducción.....	11
1.1.	Validación y verificación de los test diagnósticos genéticos moleculares.....	12
1.2.	Intolerancia al irinotecán/síndrome de gilbert.....	16
1.3.	Fundamento de la pcr.....	17
2.	Objetivos/justificación	19
3.	Material y métodos (insert gilbert syndrome kit).....	19
3.1.	Tipo de muestra, reactivos y equipos utilizados.....	19
3.2.	Procedimiento a realizar	21
4.	Resultados.....	27
4.1.	Validación/verificación del kit para su uso farmacogenético	27
4.2.	Evaluación de su implementación en la práctica asistencial	33
5.	Discusión/conclusiones.....	34
8.	Referencias bibliográficas	35
9.	Anexos	37

Índice de tablas

Tabla 1.	Tipo de muestra primaria, recipientes y aditivos.....	20
Tabla 2.	Reactivos empleados.	21
Tabla 3.	Equipos necesarios.....	21
Tabla 4.	Volúmenes para la pcr.	21
Tabla 5.	Resultados e interpretación.....	24
Tabla 6.	Diferentes genotipos e interpretación de los tests.....	25
Tabla 7.	Resultados validados y verificados.	27
Tabla 8.	Resultados obtenidos el 01/10/2021.....	29
Tabla 9.	Resultados obtenidos el 05/10/2021.....	31
Tabla 10.	Resultados obtenidos el 07/10/2021.....	31
Tabla 11.	Resultados obtenidos el 13/10/2021.....	32
Tabla 12.	Resultados obtenidos el 15/10/2021.....	32

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de la norma UNE-EN ISO 15189:2013. Modificada de la referencia (4).....	12
Figura 2. Flujograma de las dos vías generales para la implementación de un test de diagnóstico en un laboratorio de genética molecular. Adaptado de la referencia (4).	13
Figura 3. Algoritmo de decisión para la validación o verificación de un procedimiento (test genérico). Adaptado de la referencia (4).....	14
Figura 4. Figura tipos de test y pruebas para validación-verificación. Modificada de la referencia (4).	15
Figura 5. Electroferograma de una muestra homocigota para el polimorfismo UGT1A1. Homocigoto: UGT1A1*28/*28 (7/7).	23
Figura 6. Electroferograma de una muestra heterocigota para el polimorfismo UGT1A1. Heterocigota: UGT1A1*1/*28 (6/7).	23
Figura 7. Electroferograma del control del kit (HZ CONTROL) heterocigoto para el polimorfismo UGT1A1. Heterocigoto: UGT1A1*1/*28 (6/7).....	24
Figura 8: Electroferograma muestra 8806290, aparece un alelo mutado en 210 pb, y, por tanto, será homocigota para el polimorfismo UGT1A1.	29
Figura 9: Electroferograma control interno del kit, aparece un alelo wildtype a 208 pb y otro a 210 pb, y, por tanto, será heterocigoto para el polimorfismo UGT1A1.	29
Figura 10: Electroferograma muestra de agua.....	30
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa	30
Figura 12: Frecuencia de homocigotos y heterocigotos del polimorfismo UGT1A1*28	33

1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de Genética Molecular disponen de herramientas para garantizar la calidad de los resultados de los test genéticos que realizan en la práctica diaria, siendo la acreditación y certificación dos de esas herramientas. Por un lado, la certificación se basa en la norma ISO 9001, que define los requisitos que debe cumplir un sistema de garantía de calidad y que son aplicables a cualquier actividad, entre la que se incluye el diagnóstico genético molecular (1). Por su parte, los sistemas de acreditación se basan en estándares como son la ISO 17025 y la ISO 15189. Ésta última, propia de los laboratorios clínicos, está dividida en dos partes. La parte de gestión, que incluye los requisitos para los sistemas de gestión de calidad, y una segunda parte técnica que detalla los requisitos para el personal, instalaciones, equipos, procedimientos, informes y garantía de calidad. Es decir, se relacionan con el logro de la competencia en todos los aspectos de la actividad desarrollada en un laboratorio de Genética Molecular para comprobar que los resultados de los informes son correctos (2,3,4) En España, el organismo evaluador autorizado es la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). La acreditación de los laboratorios de diagnóstico genético molecular a día de hoy es voluntaria a diferencia de en otros países europeos donde si es obligatoria. Se prevé que en un futuro no muy lejano la acreditación de los laboratorios de diagnóstico genético sea obligatoria en España y es por ellos que muchos de estos laboratorios ya están acreditados o en fase de acreditarse. Con la acreditación según la norma ISO 15189 se evalúa, además, la competencia técnica para garantizar la fiabilidad de los resultados y poder realizar la adecuada toma de las decisiones clínicas. La acreditación garantiza que hacemos lo que decimos que hacemos, pero, además, que lo que hacemos es lo correcto. La implantación en los diversos Laboratorios Clínicos integrados en el sistema hospitalario de los requerimientos de la norma UNE-EN ISO 15189:2013 responde al deseo de optimizar la atención a sus clientes (Médicos /Clínicos peticionarios), destacando que el principal beneficiario va a ser el paciente.

En la figura 1, se esquematiza en forma de ciclo de mejora los requisitos de gestión y técnicos de la norma ISO 15189.

En el subapartado 5.5.1. Selección, Verificación y Validación de los procedimientos analíticos, de la norma UNE-EN ISO 15189:2013, se detalla cuando hay que validar y verificar un test/método. Es necesario guardar y tener registros de cómo se ha realizado la verificación. Debe hacerse siempre (2,5).

El laboratorio **debe validar métodos:**

- No normalizados.
- Diseñados o desarrollados por el laboratorio.
- Normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación previsto (por ejemplo, de hacerlo en ADN de sangre periférica a hacer en ADN de saliva).
- Métodos validados modificados. Por ejemplo, en genética molecular, si se cambian volúmenes, diluciones etc.

El laboratorio **debe verificar métodos**:

- Normalizados, validados por el proveedor, es decir kits utilizados sin modificar y disponiendo de información de la validación hecha por el fabricante.

En la propia norma se incluyen las definiciones de validación y verificar:

3.26 Validación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación prevista específica.

3.27 Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

Tanto la validación como la verificación deben ser lo más extensas posible y deben existir registros y evidencias objetivas de ambas.

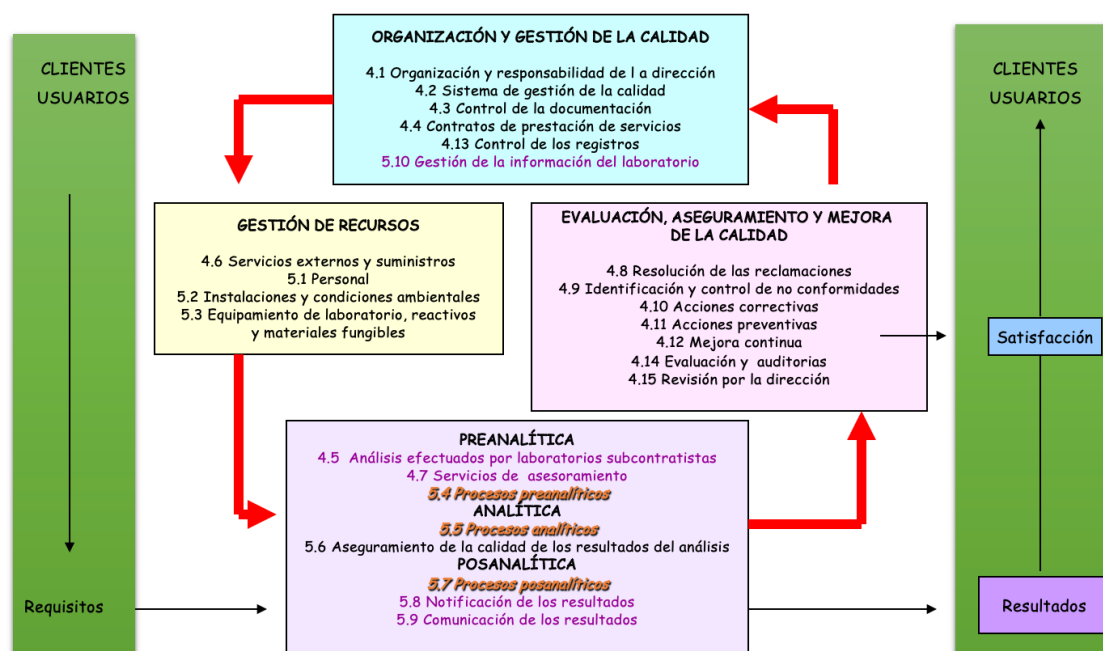


Figura 1: Esquema de la norma UNE-EN ISO 15189:2013. Modificada de la referencia (4)

1.1. Validación y verificación de los test diagnósticos genéticos moleculares

Todo nuevo test y/o técnica que se vaya a implementar en un laboratorio de genética molecular debe ser validado antes de su aplicación para el uso clínico. Es necesario para asegurar que se ofrecen los resultados apropiados a los pacientes y porque es un requisito para la acreditación del laboratorio (3,4).

La validación es “la confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se ha cumplido los requisitos para una autorización o aplicación prevista específica” (2) ¿Estamos

haciendo el test correcto? En cambio, la verificación es “la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados” (2).

El proceso de implementación de un test genético molecular para uso diagnóstico es complejo e involucra varios niveles de evaluación y validación. La etapa de desarrollo implica la evaluación tanto del proceso diagnóstico como la del técnico, para asegurar que las medidas obtenidas sean relevantes y útiles para su uso en el diagnóstico. La etapa final consiste en determinar si todo el proceso completo en términos de exactitud y precisión, cumplen los estándares previstos. Por último, los resultados de la validación analítica determinarán si en efecto, se va a implementar, y en caso de hacerlo, cómo se va a hacer (3).

En las figuras 2 y 3 se representan los pasos a seguir para la implementación en la práctica asistencial de un test de diagnóstico genético en el laboratorio de genética y el algoritmo de decisión para la validación o verificación de un test genético molecular (3,4).

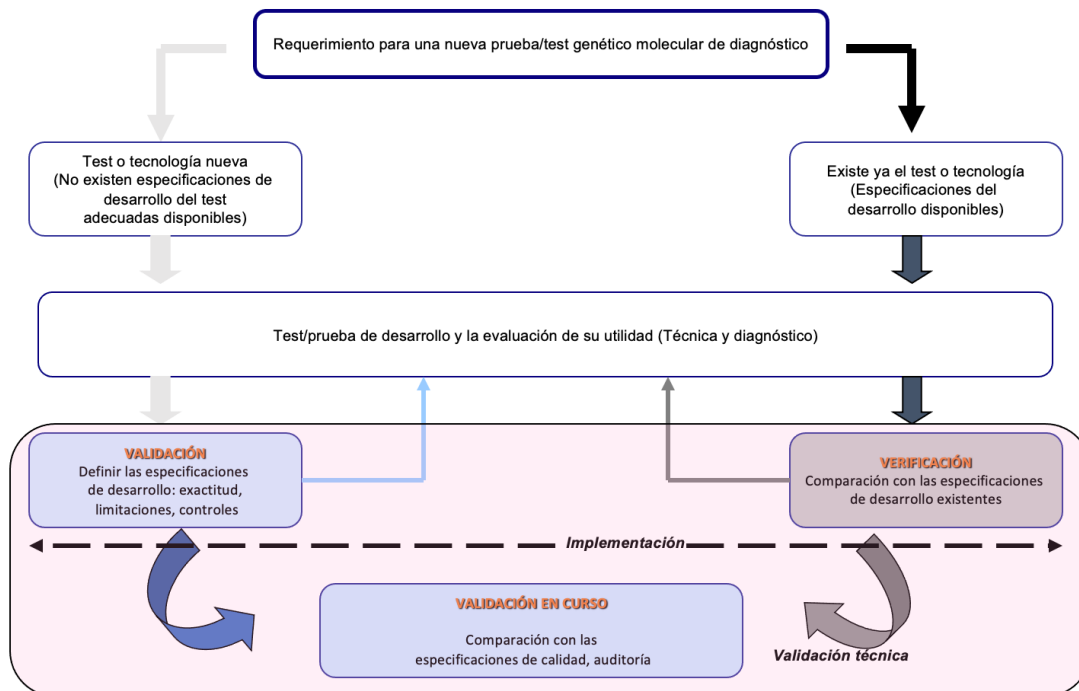


Figura 2. Flujograma de las dos vías generales para la implementación de un test de diagnóstico en un laboratorio de genética molecular. Adaptado de la referencia (4).

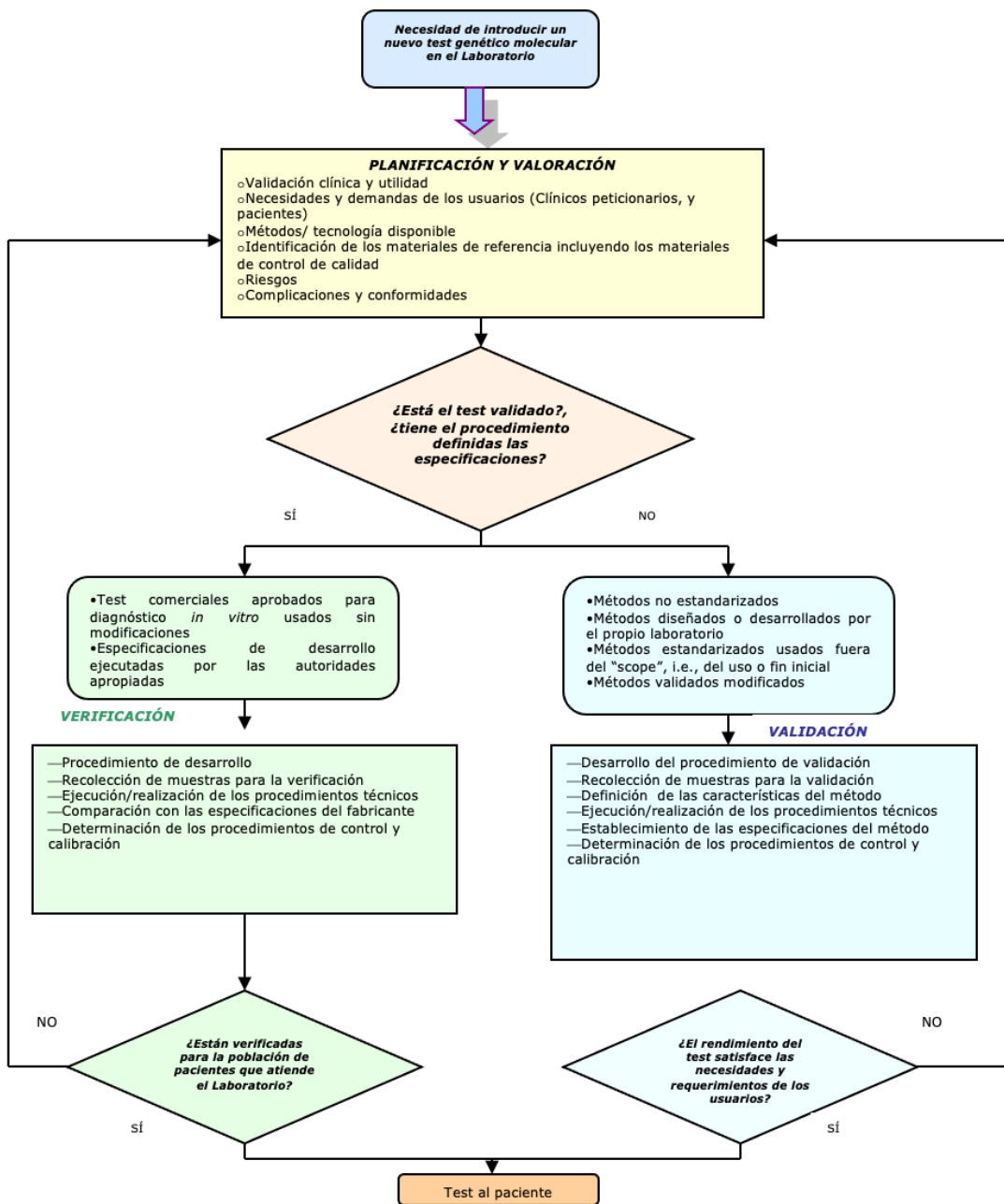


Figura 3. Algoritmo de decisión para la validación o verificación de un procedimiento (test genérico). Adaptado de la referencia (4).

A la hora de validar debemos comparar los resultados de nuestro test con un test de referencia o con unos materiales de referencia (un grupo de muestras control que tienen un estado de mutación asignados y sin ningún error).

Estos procesos tienen como objetivo confirmar que el proceso que se lleva en el laboratorio clínico tiene una fiabilidad consistente con el intencionado uso diagnóstico. La validación analítica se entiende sólo dentro del proceso en el laboratorio, y no se evalúa en la manera en la que se decide sí hacer el test o no. De hecho, las relevancias clínicas del test y la idoneidad de

tomar unas medidas u otras con respecto a diagnosticar un síndrome genético determinado se dejan para el criterio profesional. En la figura 4, se esquematizan los diferentes tipos de test a utilizar en genética y los diferentes parámetros a testar según hagamos validación/verificación.

	Descripción	Ejemplos	Sensibilidad ^a	Especificidad ^b	Veracidad ^c	Exactitud	Precisión ^d	Límite de detección	Probabilidad ^e
A	Test cuantitativo <i>El resultado puede tener cualquier valor entre dos límites (incluyendo decimales)</i>	Determinación de la carga de metilación (%); caracterización de un mosaico (p.e. Southern blot); heteroplásmido de variantes mitocondriales				+	+	+	
B	Test categóricos dónde la señal cuantitativa toma posición dentro de unas series ordinales para dar un resultado final	Cuantificación de un producto de PCR: determinación del número de repeticiones de un triplete (cuantificar el tamaño de las repeticiones), FRAXA, Enfermedad de Huntington, DM1, etc.			+	+	+	+	+
C	Test categóricos dónde la señal cuantitativa se coloca en una serie limitada de categorías predefinidas para dar el resultado final	Determinación del número de copias usando PCR o MLPA: delección de un exón o duplicación en BRCA1; dosis gen PMP22 en CMT y HNPP.			+	Establecer factores de corrección y/o cutt-off (punto de corte)			+
D	Test cualitativos dónde la verdadera señal cuantitativa puede tener uno de los muchos posibles valores, pero el resultado requerido puede únicamente tener uno de los dos posibles valores.	Escaneo de mutaciones para mutaciones desconocidas por ejemplo secuenciación, o DHPLC NGS, Sanger	+	+	+	Establecer factores de corrección y/o cutt-off (punto de corte)		+	
E	Test cualitativos (binarios) dónde la verdadera señal cuantitativa puede sólo tener uno de los dos posibles valores	Genotipado para una mutación específica por ejemplo: CFTR Phe508del en fibrosis quística o HFE Cys282Tyr en hemocromatosis/ polimorfismos DPYD o gen UGT1A1	+	+	+	Establecer factores de corrección y/o cutt-off (punto de corte)		+	+

	Usado para implementar la validación
	Usado para implementar o actualización de la validación
	Usado para actualizar la validación
++	Parámetro recomendado
+	Parámetro aplicado (menos usado)

^aSensibilidad= V.P./ (V.P. + F.N.)
^bEspecificidad= V.N./ (V.N. + F.P.)
^cVeracidad= Resultado verdadero / (Resultado verdadero + Resultado falso)
^dPrecisión debería ser medida en términos de repetibilidad e imprecisión intermedia (tan bien como reproducibilidad por validación interlaboratorios)
^eEl término "probabilidad" es usado para describir situaciones dónde una probabilidad de que el resultado es correcto puede ser asignada en la validación inicial
^fDebería ser usado en tests dónde el genotipado de bajos niveles de variaciones es requerido por ejemplo en DNA mitocondriales.

Figura 4. Tipos de test y pruebas para validación-verificación. Modificada de la referencia (4).

La marca "CE" en un dispositivo para diagnóstico *in vitro*, VERIFICA:

- Está validado por el fabricante
- Un informe de validación disponible en el laboratorio
- Propósito de uso definido
- Se mantienen y respetan las instrucciones

En la verificación de un kit se debe confirmar las especificaciones analíticas del fabricante y las previamente fijadas por el laboratorio. Se deben seguir los protocolos recomendados por las organizaciones científicas reconocidas internacionalmente (4).

1.2. Intolerancia al irinotecán/Síndrome de Gilbert

El gen *UGT1A1* se transcribe en la enzima UGT1A1, la cual es responsable de la glucuronidación hepática de la bilirrubina. La variante alélica *UGT1A1*28* posee siete repeticiones timina adenina (TA) en la región promotora del gen, en vez de las seis repeticiones TA del alelo salvaje (*UGT1A1*1*). Esta repetición extra se ha asociado con una disminución, en torno al 70%, de la actividad transcripcional del gen *UGT1A1*. La variante *UGT1A1*28* ha sido asociada con toxicidad en el tratamiento con el fármaco irinotecán, por lo que la FDA (Food and Drug Administration) recomienda en los pacientes homocigotos *UGT1A1*28/*28* iniciar el tratamiento utilizando una dosis inicial inferior para el citado fármaco. Estos pacientes deben ser vigilados para detectar posibles reacciones adversas hematológicas no habiéndose establecido la reducción exacta de la dosis (7,8,9,10,11,12).

La enzima uridin-difosfatasa-glucuronosil-transferasa juega un papel importante en el metabolismo del irinotecán, pues glucuroniza (inactivándolo) a su metabolito activo, el SN-38. La actividad de UGT1A1 varía entre los individuos, y entre los principales responsables de esta variabilidad están los polimorfismos en la región TATA del promotor UGT1A1. El número más habitual de repeticiones de TA es de 6. Cuando hay 7 repeticiones en uno de los alelos (heterocigotos 6/7), o, sobre todo en los dos alelos (homocigotos 7/7), se reduce la expresión del gen y, se glucuroniza menos el SN-38, acumulándose y produciéndose una mayor exposición al mismo con el consiguiente aumento de la toxicidad. La identificación de estos homocigotos 7/7 es importante en el caso de que se contemple la utilización de irinotecán, ya que en esos pacientes deben usarse dosis menores para evitar toxicidades excesivas. La frecuencia de los homocigotos 7/7 es variable según la zona geográfica (5-15% de la población caucásica, 12-27% de los africanos, 19-24% de los indios, 1- 2% de los asiáticos). La presencia del polimorfismo bien en heterocigosis como en homocigosis presenta una frecuencia de entorno al 26-39% en población caucásica y de entorno al 30-56% en población africana (13,14).

Irinotecán es un inhibidor de la ADN topoisomerasa I, enzima que estabiliza la estructura del ADN durante su replicación y transcripción. Los pacientes portadores en heterocigosis del alelo *UGT1A1*1/28* y en homocigosis *UGT1A1*28/*28* presentan actividad de la enzima reducida (7,8,9).

Como se ha indicado anteriormente, el irinotecán es un medicamento que se emplea en quimioterapia contra el cáncer de colon. Los esquemas que incorporan irinotecán han demostrado una mayor supervivencia global comparado con la utilización de otros fármacos. Sin embargo, el uso del irinotecán está limitado por la elevada incidencia de aparición de efectos tóxicos, fundamentalmente neutropenia (disminución aguda de glóbulos blancos en sangre), fiebre y diarrea. De hecho, la incidencia de aparición de reacciones grado 3-4 se estima en un 20-25% de los pacientes. Incluso se calcula que hasta un 7% de los pacientes que presentan neutropenia severa fallecen por complicaciones derivadas de la misma (8,9,11).

El irinotecán, antineoplásico, es un profármaco que a través de enzimas carboxylesterasas se metaboliza a su metabolito activo SN-38, el cual es 100-1000 veces más potente que el irinotecán. El SN-38 ejerce su efecto citotóxico por unión a topoisomerasas del ADN, y, por tanto, el ADN es menos estable, conduciendo así la apoptosis celular (muerte de la célula). La molécula SN-38 es lipofílica y necesita ser inactivada para su eliminación a través de la vía de la glucuronidación (familia UGT). El resultado de este proceso es una molécula hidrosoluble que se eliminará por vía biliar (70%) y renal (30%).

La presencia de la variante 28 de la UGT1A1, presente en un 3-10% de la población, está relacionada con la mayor incidencia y severidad en la aparición de efectos tóxicos y también asociada a la capacidad de glucuronizar el metabolito SN-38.

Es por ello, que la FDA recomienda una reducción de dosis de al menos un nivel para pacientes homocigotos para el alelo UGT1A1*28, con seguimiento posterior en función de la tolerancia al tratamiento.

Por otro lado, el Síndrome de Gilbert pertenece al grupo de los trastornos metabólicos humanos más comunes y se caracteriza por un nivel elevado de bilirrubina en suero. Se trata de una forma crónica y moderada de hiperbilirubinemia (aumento del nivel de bilirrubina en sangre), causada por una baja glucuronidación hepática de bilirrubina por la UDP-glucuronosiltransferasa 1 (UGT1A1) (15,16). Un polimorfismo del extremo 5' del promotor del gen UGT1A1 y/o una inserción homocigótica de pares TA (genotipo UGT1A1*28/*28 ó 7/7), da como resultado una disminución de la actividad de glucuronidación de bilirrubina y, por tanto, a el aumento en sangre del nivel de bilirrubina. Se establecen como recomendaciones que no es necesario realizar un ajuste de dosis en aquellos pacientes UGT1A1*1/*28 y en el caso de aquellos pacientes UGT1A1*28/*28, en dosis > 250 mg/m² se deberá realizar una reducción del 30% la dosis inicial e incrementar en función del recuento de neutrófilos. En el caso de dosis ≤ 250 mg/m², no es necesario ajuste de dosis (13,14).

1.3. Fundamento de la PCR

PCR son las siglas en inglés de *Polimerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa. Se trata de un procedimiento muy efectivo para generar muchas copias de un fragmento de ADN determinado in vitro. El objetivo de la técnica es simular lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, y en el tubo se mezclan los reactivos necesarios para hacerlo.

Las componentes para la PCR son (1) muestra de ADN que será nuestro ADN molde o "template"; (2) taq polimerasa (DNA polimerasa), se encarga de copiar la muestra de ADN y es resistente a altas temperaturas > 100°C; (3) oligonucleótidos de cadena sencilla, complementarios a las secuencias conocidas del ADN diana, primers o cebadores u "oligos" (hay dos tipos: forward (F) y reverse (R)); (4) los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos o dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); y (5) cloruro de magnesio MgCl₂, que estabiliza el ADN de una sola cadena.

Normalmente, las casas comerciales ofertan la “master mix”, que contiene todos los reactivos y componentes necesarios para llevar a cabo la PCR.

Esta técnica se caracteriza porque se emplea una polimerasa termorresistente que permite desnaturalizar el ADN a 94°C sin desnaturalizar el enzima y se amplifica, no todo el ADN, sino una región específica del mismo para lo que es necesario conocer las secuencias que hay a ambos lados de la región a amplificar. Es una técnica muy sensible ya que permite obtener millones de copias partiendo de una sola molécula de ADN, y muy específica ya que solo amplifica la región de interés (17).

La PCR consta de 3 fases fundamentales:

- **Fase de desnaturalización:** Es la primera etapa y se basa en la separación de las dos cadenas del ADN calentando hasta 95 °C durante 1 a 5 minutos.
- **Fase de hibridación:** Fase en la que tiene lugar la unión de los primers o cebadores a sus secuencias complementarias de la muestra de ADN. Los cebadores son secuencias de una sola cadena de 10 a 30 nucleótidos que se unen a zonas específicas (complementarias) de cada una de las cadenas desnaturalizadas del ADN. El Forward (F) es el que se une al extremo 5' del ADN y el que se une al extremo 3' del ADN es el Reverse (R).
- **Fase de extensión o elongación:** En esta fase la Taq polimerasa incorpora los nucleótidos para replicar el fragmento de ADN, es decir, tiene lugar la elongación del primer por acción de la DNA polimerasa (72°C). Por cada molécula de ADN molde inicial se generan dos moléculas de ADN molde en el primer ciclo. Todo el proceso se repite entre 35 y 40 veces y hay un incremento exponencial de la cantidad de copias. La cantidad relativa de ADN se calcula como 2^{n-1} , siendo n el número de ciclos (17).

Todas las fases de la PCR tienen lugar en el termociclador, sistema automático programable para realizar la PCR, que calienta y enfría la reacción en periodos cortos de tiempo para que se lleve a cabo la replicación del ADN.

Por otro lado, la electroforesis en gel de agarosa se emplea para visualizar la cantidad y calidad del ADN obtenido y comprobar si hay degradación del mismo. La muestra de ADN se coloca en el gel de agarosa que, sometido a un campo eléctrico, propicia la migración de las moléculas de ADN del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). El gel se sumerge en un tampón básico (pH 8) que garantiza que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente y por tanto se desplacen hacia el polo positivo. Cuanto más grande es el fragmento de ADN, más se retiene en la matriz porosa y menos es su movilidad electroforética.

2. OBJETIVOS/JUSTIFICACIÓN

- 1) Validar y verificar un kit comercial, con uso inicial para el estudio de Síndrome de Gilbert, para su aplicación en la práctica asistencial en la detección del polimorfismo UGT1A1*28 en el gen *UGT1A1*, asociado con la intolerancia a Irinotecán (farmacogenética) y Síndrome de Gilbert (digestivo).
- 2) Evaluar la frecuencia de la presencia del polimorfismo UGT1A1*28 en el gen *UGT1A1* en heterocigosis y homocigosis en la población a estudio (oncológica) antes de tratar con Irinotecan así como en pacientes con sospecha de Síndrome de Gilbert, en el periodo de 4 meses tras la implementación del kit en el laboratorio de diagnóstico genético molecular del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

El estudio molecular permite evitar procedimientos de diagnóstico invasivos, como la biopsia hepática, pudiendo establecer el diagnóstico y pronóstico adecuados, así como el establecimiento de procedimientos terapéuticos correctos. Es fundamental poder determinar la presencia del polimorfismo UGT1A1*28 en pacientes oncológicos antes de iniciar el tratamiento con irinotecan para evitar posibles efectos adversos y toxicidad, de ahí la necesidad de implementar un test de diagnóstico genético que permita detectar con una fiabilidad de un 99% la presencia de dicho polimorfismo en muestras de ADN de sangre periférica, permitiendo tener los resultados en un tiempo prudencial inferior a 7 días naturales y que esto permita realizar un ajuste adecuado y personalizado de la dosis de irinotecan al paciente. La validación de este kit para su uso en la práctica asistencial es de vital importancia para poder realizar una posterior acreditación del estudio genético por la norma ISO 15189 de acreditación de los laboratorios clínicos.



3. MATERIAL Y MÉTODOS (insert Gilbert Syndrome kit)

3.1. Tipo de muestra, reactivos y equipos utilizados

El tipo de muestra a la que aplica este procedimiento es ADN extraído de linfocitos de sangre periférica. El ADN se extrae de las muestras de sangre periférica de forma automatizada (QIASymphony SP). La muestra de elección es sangre total con EDTA como anticoagulante (tubo tapón malva 4 mL o similar), ver Tabla 1 En casos excepcionales, se podrá trabajar con muestras de ADN previamente extraído. Se establecen una serie de criterios de rechazo de las muestras que se indican a continuación:

- Muestras no identificadas, o incorrectamente etiquetadas.
- Muestras destaponadas, derramadas o con defectos en el contenedor.
- Muestras con escasa concentración de ADN (<10 ng/μL). El límite de detección de la técnica es de 10 ng de ADN.
- Muestras de ADN con pureza no adecuada medida a través del Ratio de absorbancia 260/280. Si este ratio es >2,2 o <1,8 las muestras serán rechazadas y se solicitará una nueva extracción del ADN o envío de muestra primaria.

Tabla 1. Tipo de muestra primaria, recipientes y aditivos.

Tipo de muestra	Recipiente	Contenedor	Aditivo
Sangre periférica	Tubo de vacío tapón MALVA (4 mL o similar)		EDTA
ADN	Tubo eppendorf (0.5 ml o similar)		Sin aditivo

El kit que se va a validar/verificar en este trabajo es el **kit Experteam s.r.l.**, se basa en una PCR en la que se amplifica la secuencia TATA, contenida en el gen promotor UGT1A1 (UDP-glucuronosiltransferasa 1), el cual, en pacientes afectados por el síndrome de Gilbert, muestran una inserción de TA. Los A(TA)₇TAA alelos mutados son reconocidos por los A(TA)₆TAA alelos wild types por medio de electroforesis capilar marcado con una tinción fluorescente. Se trata de una PCR con electroforesis capilar (análisis de fragmentos) y detección fluorescente mediante un secuenciador ABI 3130xl y software GeneMapper 4.0. Se amplifica la secuencia TATA contenida en el gen promotor UGT1A1 con un par de primers específicos, los cuales están marcados con una tinción fluorescente. El método de detección empleado se fundamenta en la adaptación de un termociclador y un fluorímetro, que permite detectar la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al DNA. La monitorización de esta fluorescencia permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de los ciclos. A continuación, para la caracterización de los alelos amplificados durante la PCR es necesario determinar sus curvas de fusión. Para ello, se someten las muestras ya amplificadas a un aumento muy lento y progresivo de la temperatura, durante el cual se registra la emisión de fluorescencia, que va desapareciendo a medida que los heterodúplex formados por el DNA y la sonda se desnaturalizan. Mediante la evaluación de la relación entre la fluorescencia y la temperatura se monitorizan los comportamientos de las curvas de fusión, que permiten diferenciar los distintos heterodúplex. Este kit permite la detección del polimorfismo (rs8175344) UGT1A1*28 [(TA)₇TAA]; NM_000463.2:c.-53_-52. Es decir, permite detectar los polimorfismos UGT1A1*1/*1, *1/*28 y *28/*28 (también conocidos como 6/6, 6/7 y 7/7 respectivamente).

Se trata de un test categórico tipo E, cualitativo, es decir, la verdadera señal cuantitativa puede tener solo uno de entre dos posibles valores. En la validación de un test cualitativo se debe emplear un control negativo y positivo y confirmar que los resultados coinciden con los valores asignados. Se puede evaluar la exactitud a través de los resultados obtenidos en programas de intercomparación/control de calidad externo. La reproducibilidad se evaluará procesando muestras por duplicado en dos series diferentes, por ejemplo, y también se puede evaluar la comparabilidad analizando las muestras por el método anterior o de referencia y comparando que se obtienen los mismos resultados.

En la tabla 2 se muestra la relación de reactivos y su ubicación. Todos los reactivos necesarios están incluidos en el Kit.

Tabla 2. Reactivos empleados.

Reactivo / Kit	Ubicación
Kit Experteam s.r.l. (40 determinaciones)	EQ-Z2(E)M_L-GE-11 (sala Pre-PCR)
Hi – Di formamida	EQ-Z2(E)M_L-GE-23 (sala Post-PCR)
Marcador GS500 LIZ	EQ-Z2(E)M_L-GE-23 (sala Post-PCR)

En la tabla 3 se detalla todo el equipamiento utilizado para poder llevar a cabo el test y la validación/verificación del kit.

Tabla 3. Equipos necesarios.

Equipo / Etapa	Proceso	Ubicación
Termociclador	PCR	Sala Inter-PCR
3130XL Genetic Analyzer (EQ-Z2(E)M_L-GE-28)	Secuenciación	Sala Instrumentación
Foundation Data Collection v.3.0 (Software)	Análisis Datos	Sala Instrumentación
GeneMapper 4.0 (Software)	Análisis Datos	Sala Instrumentación

3.2. Procedimiento a realizar

Procedimiento de análisis del uso del kit Experteam s.r.l.:

Etapa 1: Preparación de las muestras para la PCR

Primero se prepara la “reaction mix”/mezcla de reacción. Para ello, se emplea 22,7 μL de “6FAM-GS Master Mix”, 0,3 μL de “ExpertTaq polimerasa” y 2,0 μL de muestra ADN, para unos 25 μL de reacción PCR. En cada kit viene: “6FAM-GS Master Mix” y “ExpertTaq polimerasa” y el control positivo (heterocigoto para el polimorfismo UGT1A1). Es importante haber realizado una dilución 1/10 previamente de las muestras de ADN añadidas.

Tabla 4. Volúmenes para la PCR.

	Volumen por test (reacción) (μL)
6FAM-GS Master Mix	22,7 μL

ExperTaq pol.	0,3 μ L
Control positivo	2,0 μ L
DNA	2,0 μ L (20ng)

A continuación, se pipetea 25 μ L de esta mezcla en cada pocillo en la placa óptica. Se sellan las placas con sus respectivos cubres y se mueven fuerte para evitar posibles burbujas. Una vez comprobado que no se han formado burbujas, se introduce la placa en el termociclador y comienza el programa de amplificación. Una vez completado el ciclo completo, se analiza el producto de la PCR. El proceso consta de tres etapas:

- 94°C 5 min
- (94°C 30 sec, 60°C 60 sec, 72°C 30 sec) x 30 veces
- 72°C 30 min

Etapas 2: preparación de las muestras para la electroforesis capilar

En primer lugar, se deben preparar las muestras para el secuenciador. Para ello, se realiza una dilución formada por 18 μ L de H₂O y 2 μ L del producto de PCR.

Luego, se prepara la mix/mezcla. Suponiendo n el número de muestras que se van a analizar, la mix se debe preparar con: 14,5 μ L de Formamida Hi-Di x (n+1) muestras + 0,5 μ L Standard 500LIZ x (n+1) muestras.

Se añaden 1,5 μ L de esta mix (formamida + marcador) en cada uno de los pocillos de la placa y a continuación, se añade 1 μ L de producto de PCR diluido. Tener en cuenta que los pocillos vacíos que no se hayan llenado con esta mezcla anterior, se deben rellenar con agua destilada. Una vez hecho, se cierra la placa herméticamente y se lleva a un termociclador para desnaturalizar el producto de la PCR: 94°C durante 3 minutos asociado a 4°C durante 30 segundos. Esta última etapa en frío es para que no se degrade el producto de la PCR.

Una vez acabada la desnaturalización, se centrifuga la placa para eliminar cualquier burbuja generada en los pocillos durante el proceso y se carga en el secuenciador de 16 capilares Abi 3130 xl.

Se debe analizar junto con cada serie de muestras, el control del kit y un blanco (muestra con sólo agua, nada de ADN) para descartar la presencia de contaminación.

Interpretación de los resultados

Se muestran a continuación los diferentes resultados posibles tras el análisis. En cada serie de muestras a analizar debe incluirse el control heterocigoto suministrado por el kit (HZ CONTROL), además de un blanco (en vez de muestra de ADN, agua).

Se observará un alelo wild type $A(TA)_6TAA$ con un tamaño de 207pb y el alelo mutado $A(TA)_7TAA$ con un tamaño de 209pb. (Se debe tener en cuenta que puede en cada condición de carrera existir un error de +/-1 pb en el tamaño de los alelos, por ello siempre debe analizarse con cada muestra el control del kit para identificar con exactitud el tamaño en pb del alelo wild type y del alelo mutado).

- Normal, ausencia del polimorfismo en el gen *UGT1A1*: un alelo con tamaño de 207pb.
- Heterocigoto para el polimorfismo en el gen *UGT1A1*: un alelo wild type con tamaño de 207pb y un alelo mutado con tamaño de 209pb.
- Homocigoto para el polimorfismo en el gen *UGT1A1*: un alelo con tamaño de 209pb.

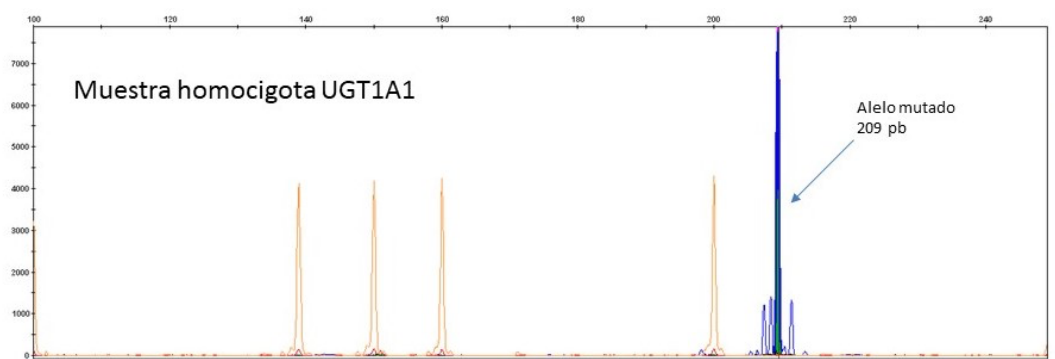


Figura 5. Electroferograma de una muestra homocigota para el polimorfismo UGT1A1. Homocigoto: $UGT1A1^*28/^*28$ (7/7).

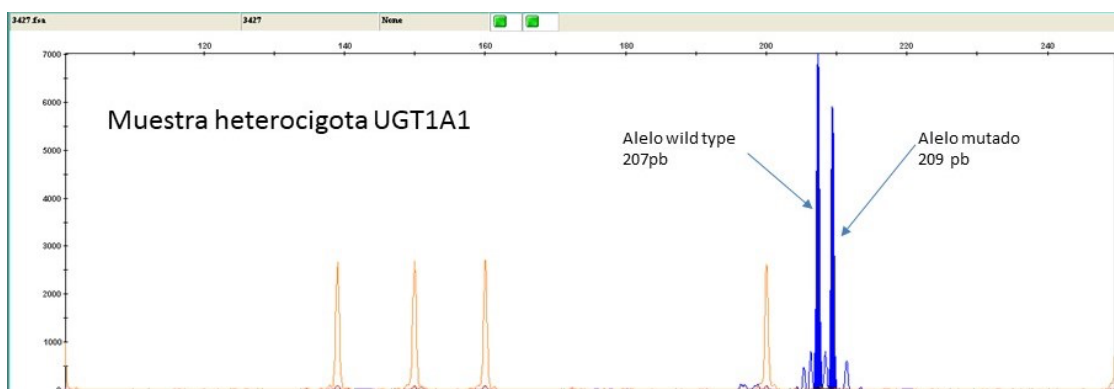


Figura 6. Electroferograma de una muestra heterocigota para el polimorfismo UGT1A1. Heterocigoto: $UGT1A1^*1/^*28$ (6/7).

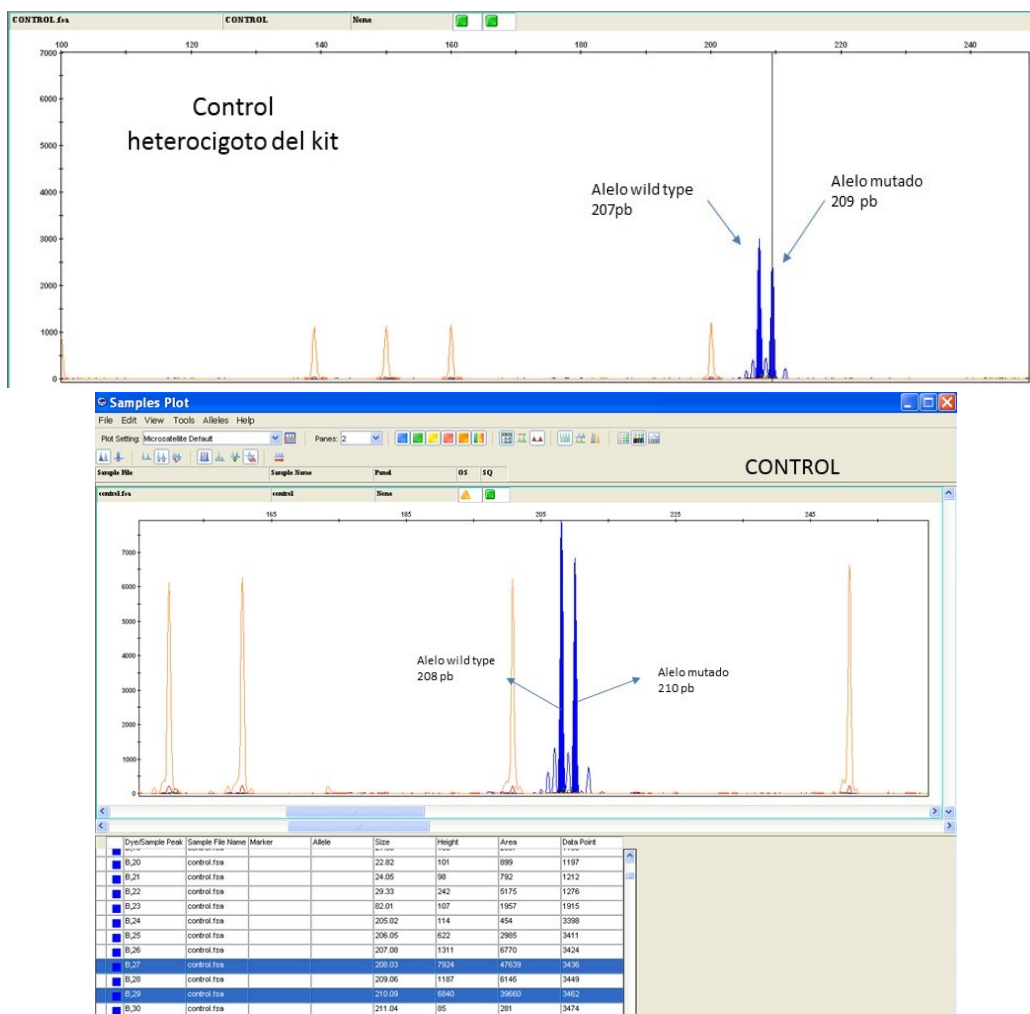


Figura 7. Electroferograma del control del kit (HZ CONTROL) heterocigoto para el polimorfismo UGT1A1. Heterocigoto: UGT1A1*1/*28 (6/7)

Tabla 5. Resultados e interpretación

Resultado	Interpretación
Un único alelo (pico) con tamaño de 207pb	Normal UGT1A1*1/*1 (6/6) Muestra homocigota wild-type
Presencia de un pico de 207pb (correspondiente al alelo wild-type) y un pico de 209pb (correspondiente al alelo mutado A(AT) ₇ TAA)	Heterocigoto UGT1A1*1/*28 (6/7) Muestra heterocigota
Un único alelo (pico) tamaño de 209pb (correspondiente al alelo mutado A(AT) ₇ TAA)	Homocigoto UGT1A1*28/*28 (7/7) Muestra homocigota mutada

En la siguiente tabla se recogen las diferentes posibilidades de interpretación de los resultados obtenidos.

El número más habitual de repeticiones de TA es de 6, siendo la mayor parte de los individuos homocigotos 6/6. Cuando hay 7 repeticiones en uno de los alelos (heterocigotos 6/7), pero sobre todo cuando esto sucede en los dos alelos (homocigotos 7/7).

Tabla 6. Diferentes genotipos e interpretación de los tests.

Genotipo	Intolerancia a Irinotecán	Síndrome de Gilbert
Normal UGT1A1*1/*1 (6/6)	No existe deficiencia de la actividad de la enzima UGT1A1.	Se descarta que el cuadro clínico de ictericia e hiperbilirrubinemia del/la paciente sea debido a la presencia de este polimorfismo.
Heterocigoto UGT1A1*1/*28 (6/7)	Los pacientes portadores en heterocigosis del alelo UGT1A1*1/*28 presentan actividad de la enzima UGT1A1 disminuida. Existe riesgo de toxicidad severa con irinotecan, incluyendo diarrea y neutropenia.	La presencia, en heterocigosis, del polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1, provoca que la actividad de la enzima uridin-difosfatasa-glucuronosil-transferasa codificada por este gen se vea reducida en un 30%-35%, lo que tiene como consecuencia la aparición de una hiperbilirrubinemia moderada en los pacientes afectados.
Homocigoto UGT1A1*28/*28 (7/7)	Los pacientes portadores en homocigosis del alelo UGT1A1*28/*28 presentan actividad de la enzima UGT1A1 disminuida. Existe riesgo de toxicidad severa con irinotecan, incluyendo diarrea y neutropenia (grado 3-4).	La presencia, en homocigosis, del polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1, provoca que la actividad de la enzima uridin-difosfatasa-glucuronosil-transferasa codificada por este gen se vea reducida en un 70%-80%, lo que tiene como consecuencia la aparición de una hiperbilirrubinemia en los pacientes afectados. Diagnóstico de Síndrome de Gilbert.

Validación-verificación del kit Experteam s.r.l.:

Realización de la validación del kit (técnica PCR mediante electroforesis capilar con detección fluorescente) con muestras de pacientes testadas previamente en otro laboratorio (LABGENETICS, Madrid) y con otro kit-metodología, evaluación del volumen de muestra necesario, condiciones reales con el secuenciador y software, etc. *in situ*. Realización de un intercomparativo entre los dos laboratorios con métodos diferentes. Para la validación se emplearon muestras de ADN de pacientes a los que se les realizó previamente el estudio genético de dicho polimorfismo por otra metodología en otro centro (LABGENETICS) en la práctica asistencial en la Sección de Genética del HUMS y de los que se conoce ya el resultado (consentimiento informado para la realización del estudio genético del paciente para la realización del estudio genético Síndrome. de Gilbert y presencia del polimorfismo en el gen UGT1A1).

Para la verificación del kit, se analizaron las 7 muestras (6 homocigotas y 1 heterocigota) realizándoles una dilución del 1/10, en días distintos, en diferentes termocicladores (Verity 96Well ThermolCycler y EQ-24-Z2(E)M-L-GEN (EQ-2)) y por diferentes personas (técnicos de laboratorio y yo como alumna en prácticas), etc. Los datos se detallan más adelante en el apartado 4.1

Estadística/análisis de los datos

En lo referente al segundo objetivo del presente trabajo se realizó un estudio descriptivo retrospectivo con datos pseudonimizados durante 4 meses desde febrero a mayo de 2022 ambos incluidos.

Los datos han sido obtenidos del programa MODULAB (SIL en la sección de Genética del Servicio de Bioquímica Clínica del HUMS). Se han procesado en el ordenador personal del FEA de la sección de genética del HUMS, encargada de la realización de dichos estudios genéticos y de la utilización del citado Kit.

La evaluación estadística de los resultados de evaluación de la implementación del test en la práctica asistencial para la determinación del polimorfismo UGT1A1*28 se realizó en la base de datos Excel.

Ética y consentimiento informado de los pacientes

El presente trabajo fin de grado fue presentado al CEIC Aragón (CEICA), el cuál en su reunión del día 23/02/2022, Acta Nº 04/2022 lo evaluó y emitió el **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto** con referencia **C.I. PI22/004. Se adjunta como anexo de este trabajo.**

Las muestras empleadas para la validación/verificación del kit contaron con el consentimiento de los pacientes. Los pacientes firmaron el consentimiento informado para la realización de los estudios genéticos moleculares a nivel asistencial en el que dieron su conformidad a usar el

excedente de su muestra para validaciones/verificaciones y/o como uso de control de calidad externo. Se adjunta el modelo de consentimiento informado para la realización de estudios genéticos moleculares aprobado por la Unidad de Calidad Asistencial del Sector II del Servicio Aragonés de Salud.

Una vez puesto en marcha el kit en la práctica asistencial los pacientes firmaban el consentimiento informado para la realización de estudios genéticos moleculares en la práctica asistencial, se elaboró un consentimiento informado específico, aprobado por el CEICA, para el presente trabajo fin de grado, que también era firmado por los pacientes. Se adjunta dicho modelo de consentimiento.

4. RESULTADOS

4.1. Validación/verificación del kit para su uso farmacogenético

En la tabla siguiente se encuentran recogidos los resultados del estudio de concordancias en la determinación de 7 muestras (6 homocigotas y una heterocigota) para el polimorfismo UGT1A1 (A(TA)7TAA) con material de referencia, muestras ya estudiadas previamente en el laboratorio LABGENETICS, Madrid.

Tabla 7. Resultados validados y verificados.

Nº Muestra (nº identificación interno laboratorio)	Concentración ADN (dilución realizada 1/10)	LABGENETICS- Madrid (referencia)	H. Miguel Servet 1 (SIA)	Concordancia	Veracidad
1 (7700203)	405,7 ng/μL (39,5 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%
2 (7902876)	299,5 ng/μL (29 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%

3 (8240982)	296,1 ng/ μ L (29 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%
4 (8554237)	185,1 ng/ μ L (17,5 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%
5 (8806290)	260,8 ng/ μ L (25 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%
6 (8852860)	171,8 ng/ μ L (16,2 H ₂ O + 1 de muestra)	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Homocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%
7 (9599582)	350,1 ng/ μ L (34 H ₂ O + 1 de muestra)	Heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	Heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA en el promotor del gen UGT1A1	100%	100%

A continuación, se especifican las muestras obtenidas cada día, con sus correspondientes resultados.

Tabla 8. Resultados obtenidos el 01/10/2021

Muestra	Resultado
8806290 homocigota para el polimorfismo A(TA) ₇ TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
Control Kit heterocigoto para el polimorfismo A(TA) ₇ TAA (alelo 207 y 209 pb)	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)
H ₂ O NO AMPLIFICACIÓN (NA)	NA
Realización gel de agarosa (amplificación del producto de PCR)	OK

Equipo	Lote	Técnico	FEA	Fecha
Verity 96Well ThermolCycler	GS180321/U (Ref: G5,01FL) (FECHA CADUCIDAD Oct 22)	PEJ/ MMP (alumna en prácticas)	SIA	1/10/21

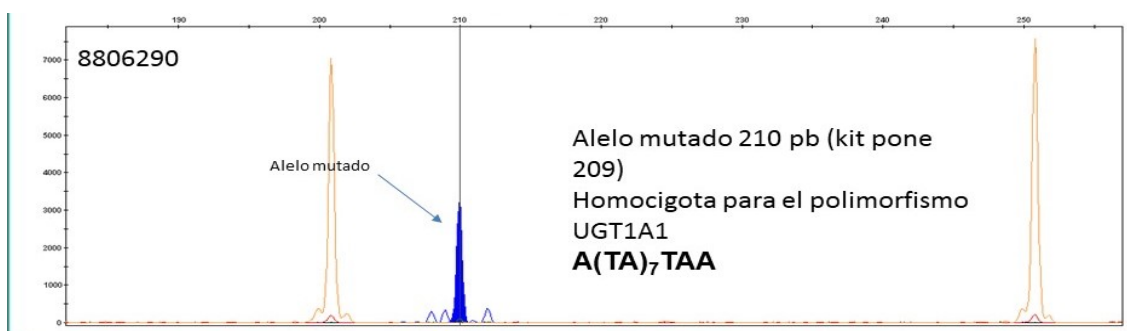


Figura 8: Electroferograma muestra 8806290, aparece un alelo mutado en 210 pb, y, por tanto, será homocigota para el polimorfismo UGT1A1.

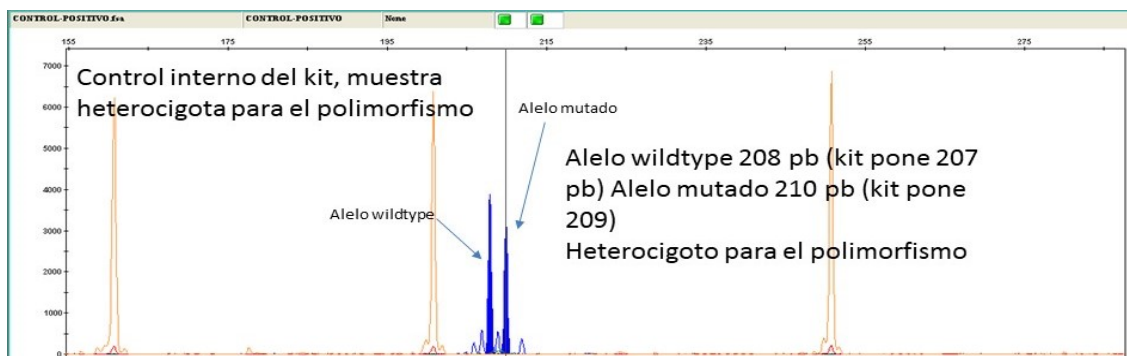


Figura 9: Electroferograma control interno del kit, aparece un alelo wildtype a 208 pb y otro a 210 pb, y, por tanto, será heterocigoto para el polimorfismo UGT1A1.

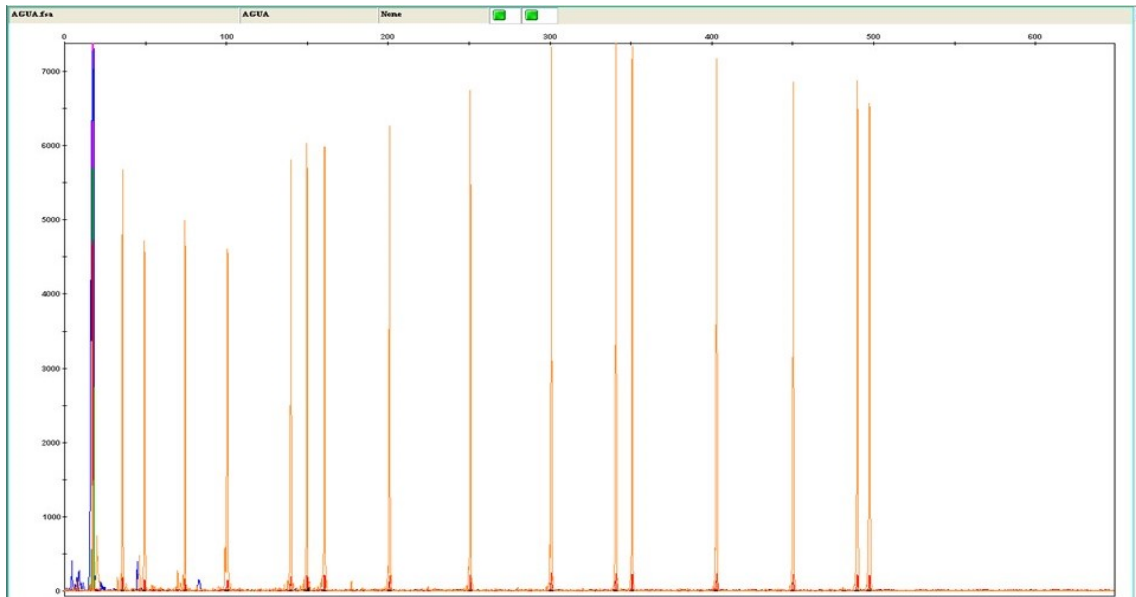


Figura 10: Electroferograma muestra de agua.

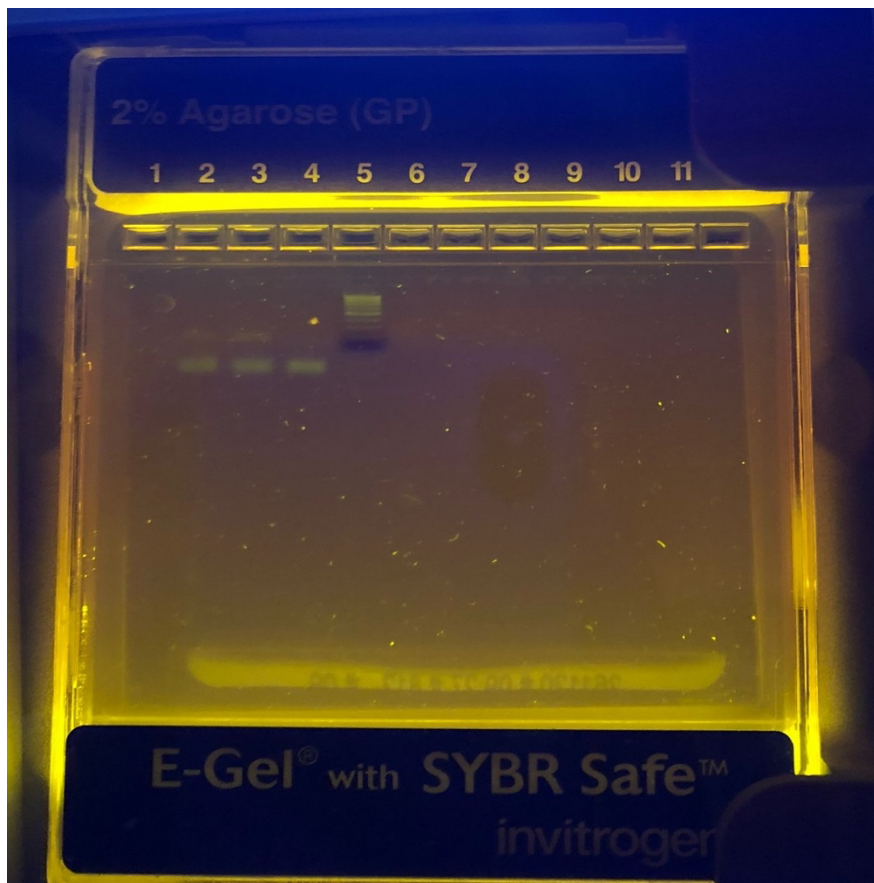


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de: Calle 1: vacía. Calle 2: muestra 8806290. Calle 3: control interno del kit. Calle 4: muestra de agua. Calle 5: marcador de peso molecular

Los electroferogramas obtenidos el resto de los días se adjuntan en el anexo del presente trabajo.

Tabla 9. Resultados obtenidos el 05/10/2021

Muestra	Resultado
9599582 heterocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Het (dos alelos uno de 207pb y un 2º de 209pb)
7700203 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 209 pb)
8240982 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 209 pb)
8554237 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 209 pb)
7902876 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 209 pb)
8852860 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 209 pb)
Control Kit heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA (alelo 207 y 209 pb)	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)

Equipo	Lote	Técnico	FEA	Fecha
EQ-24-Z2(E)M-L-GEN (EQ-2)	GS180321/U (Ref: G5,01FL) (FECHA CADUCIDAD Oct 22)	PEJ/ MMP (alumna en prácticas)	SIA	5/10/21

Tabla 10. Resultados obtenidos el 07/10/2021

Muestra	Resultado
8806290 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
8240982 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
8852860 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
8554237 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
Control Kit heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA (alelo 207 y 209)	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)

Equipo	Lote	Técnico	FEA	Fecha
Verity 96Well ThermolCycler	GS180321/U (Ref: G5,01FL) (FECHA CADUCIDAD Oct 22)	PEJ/ MMP (alumna en prácticas)	SIA	7/10/21

Tabla 11. Resultados obtenidos el 13/10/2021

Muestra	Resultado
9599582 heterocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)
7700203 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
7902876 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
Control Kit heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA (alelo 207 y 209)	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)

Equipo	Lote	Técnico	FEA	Fecha
EQ-24-Z2(E)M- L-GEN	GS180321/U (Ref: G5,01FL) (FECHA CADUCIDAD Oct 22)	PEJ/ MMP (alumna en prácticas)	RGT	13/10/21

Tabla 12. Resultados obtenidos el 15/10/2021

Muestra	Resultado
8240982 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
8554237 homocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Hom (un alelo mutado 210 pb)
9599582 heterocigota para el polimorfismo A(TA)7TAA	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)
Control Kit heterocigoto para el polimorfismo A(TA)7TAA (alelo 207 y 209)	Het (dos alelos uno de 208pb y un 2º de 210pb)

Equipo	Lote	Técnico	FEA	Fecha
Verity 96Well ThermolCycler	GS180321/U (Ref: G5,01FL) (FECHA	PEJ/ MMP (alumna en prácticas)	RGT	15/10/21

	CADUCIDAD Oct 22)			
--	----------------------	--	--	--

4.2. Evaluación de su implementación en la práctica asistencial

Se ha realizado el estudio en un total de 79 muestras recogidas durante 4 meses, tras la implementación del kit en el laboratorio de diagnóstico genético molecular. A partir de estas muestras, se ha evaluado la frecuencia de la presencia del polimorfismo UGT1A1*28 en el gen *UGT1A1* en heterocigosis y homocigosis en la población a estudio (oncológica) antes de la aplicación del Irinotecan así como en pacientes con sospecha de Síndrome de Gilbert. Los resultados obtenidos indican que, del total de muestras de pacientes recogidas, el 18% presentan el polimorfismo heterocigoto, el 37% tienen el polimorfismo homocigoto, y el 45% son normales.

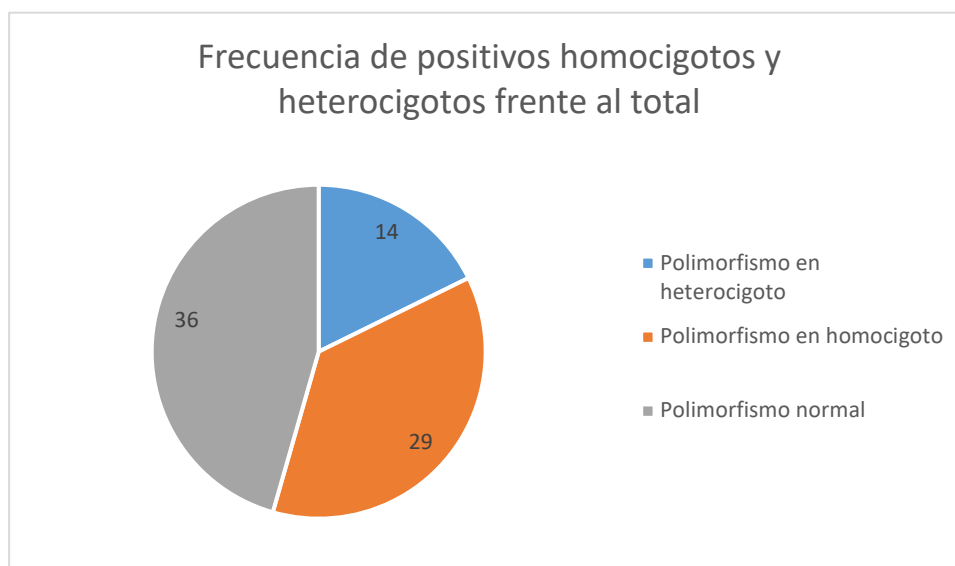


Figura 12: Frecuencia de homocigotos y heterocigotos del polimorfismo UGT1A1*28

Asimismo, se ha estudiado la influencia del sexo en los resultados. Al estudiar la frecuencia del sexo en pacientes homocigotos, se concluye que el 43% son mujeres y el 57% son hombres. Por tanto, se observa cómo no hay una diferencia muy significativa. De igual manera, se hace lo mismo para pacientes heterocigotos, y se obtiene que el 61% son mujeres, y el 39% son hombres. Las gráficas obtenidas se adjuntan en el anexo del presente trabajo.

En pacientes heterocigotos, el tipo de cáncer que predomina claramente sobre el resto es el cáncer de páncreas con un 54%, seguido del cáncer de colon con un 14%. Por su parte, en pacientes homocigotos, el principal tipo de cáncer sería el de colon con un 50%, seguido del síndrome de Gilbert con un 30%, y cabría destacar que no se han recogido datos de pacientes

homocigotos con cáncer de páncreas. De igual forma, las gráficas obtenidas se adjuntan en el anexo del presente trabajo.

5. DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten asegurar que el Kit EXPESTEAM (GILBERT SYNDROME KIT-FL) puede emplearse para el estudio de la presencia del polimorfismo A(TA)₇TAA en el gen UGT1A1, ya que los resultados de concordancia han sido del 100% (intra e inter laboratorio). Además, se verifica que para el estudio en muestras de pacientes se debe diluir la muestra al 1/10 (siendo la concentración mínima que se detecta 10ng y a su vez se visualiza de forma óptima el electroferograma). Se verifica que no es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa para verificar que se ha producido ampliación en la PCR, por tanto, no se realizará este paso.

Se considera VALIDADO y VERIFICADO el Kit y se autoriza su empleo para el uso previsto para la presencia del polimorfismo A(TA)₇TAA en el gen *UGT1A1* para farmacogenética (estudio de intolerancia al irinotecán y sus metabolitos) y para el estudio del Síndrome de Gilbert. De hecho, ya se ha elaborado un procedimiento para el laboratorio (PTA) para su uso en farmacogenética que está implementado en la práctica asistencial

En lo referente a la frecuencia del polimorfismo, se ve que el porcentaje de pacientes que presentan el polimorfismo en homocigosis en la población estudiada es relevante un 37% respecto al total y en heterocigosis un 18%. Es decir, un 55% de los pacientes estudiados pueden desarrollar toxicidad ante el tratamiento al irinotecán de ahí la necesidad de estudiar previamente la presencia del polimorfismo UGT1A1*28 antes de iniciar el tratamiento para evitar toxicidades y eventos adversos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNE-EN ISO 9001:2008 Sistemas de gestión de la Calidad. Requisitos.
2. Asociación Española de Normalización (AENOR). Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. UNE-EN ISO 15189. Madrid: AENOR; 2013.
3. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(12):1276-88.
4. Izquierdo Álvarez S. Control y gestión de la calidad en los laboratorios de genética molecular. En: Manual de Formación Continuada 2014-2015: la eficiencia en el Laboratorio Clínico. Editor: Asociación Española de Biopatología Médica (A.E.B.M.). Noviembre 2014; 10: 175-200. I.S.B.N.:978-84-617-1805-4.
5. ENAC. [Internet] (citado 20 de junio de 2022). Disponible en: <https://www.enac.es/web/enac/quienes-somos/-que-es-enac>
6. Bernabeu Andreu FA, Izquierdo Álvarez S, Contreras Sanfeliciano T. Procesos analíticos. En: Guía para el profesional del laboratorio clínico en la acreditación por la norma UNE-EN ISO 15189:2013. Editor: Comité de Comunicación de la SEQC. 2015; 3: 225-42. ISBN: 978-84-89975-44-6.
7. Takano M, Sugiyama T. UGT1A1 polymorphisms in cancer: impact on irinotecan treatment. *Pharmgenomics Pers Med*. 2017;10:61-8.
8. Dean L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. En: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, et al., editores. Medical Genetics Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012 [citado 29 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294473/>
9. Riera P, Salazar J, Virgili AC, Tobeña M, Sebío A, Gallano P, et al. Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecan-induced severe toxicity. *Br J Clin Pharmacol*. junio de 2018;84(6):1389-92.
10. Yang Y, Zhou M, Hu M, Cui Y, Zhong Q, Liang L, et al. UGT1A1*6 and UGT1A1*28 polymorphisms are correlated with irinotecan-induced toxicity: A meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol*. octubre de 2018;14(5):e479-89.
11. Fujii H, Yamada Y, Watanabe D, Matsushashi N, Takahashi T, Yoshida K, et al. Dose adjustment of irinotecan based on UGT1A1 polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;83(1):123-9.
12. Kimura K, Yamano T, Igeta M, Imada A, Jihyung S, Babaya A, et al. UGT1A1 polymorphisms in rectal cancer associated with the efficacy and toxicity of preoperative chemoradiotherapy using irinotecan. *Cancer Sci*. diciembre de 2018;109(12):3934-42.
13. Ha VH, Jupp J, Tsang RY. Oncology Drug Dosing in Gilbert Syndrome Associated with UGT1A1: A Summary of the Literature. *Pharmacotherapy*. agosto de 2017;37(8):956-72.
14. Wagner K-H, Shiels RG, Lang CA, Seyed Khoei N, Bulmer AC. Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci*. marzo de 2018;55(2):129-39.
15. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res*. marzo de 2016;79(3):378-86.

16. Vikrant Sood, Bikrant Bihari Lal, Shvetank Sharma, et al. Gilbert's Syndrome in Children with Unconjugated Hyperbilirubinemia - An Analysis of 170 Cases. *Indian J Pediatr.* 2021;88(2):154-157.
17. Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL, et al. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA.* 4a ed. Canada: ASM Press; 2010; p108-115.

9. ANEXOS

9.1 Documento de información para el participante

Título de la investigación: Validación de un kit comercial (diagnóstico del síndrome de Gilbert) para la determinación del polimorfismo UGT1A1*28 (intolerancia al irinotecan): evaluación de su implementación en la práctica asistencial.

Promotor: Dra. Silvia Izquierdo Álvarez (Jefa Sección Genética del HUMS)

Investigadores Principales /Alumna: María Mayoral Pallarés **Tfno:** 976 76 56 85

E-mail contacto: mmayoralpa@gmail.com/sizquierdo@salud.aragon.es

Centro: Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza).

1. Introducción:

Nos dirigimos a usted para solicitar su participación en un proyecto de investigación que estamos realizando en la Sección de Genética del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) por parte de una estudiante para la realización de su trabajo fin de grado estando tutorizada por la Jefa de la Sección de Genética. Su participación es voluntaria, pero es importante para obtener el conocimiento que necesitamos. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética, pero antes de tomar una decisión es necesario que:

- lea y entienda la información que contiene el documento
- haga todas las preguntas que considere necesarias
- firme el consentimiento informado, si finalmente desea participar.

Si decide participar se le entregará una copia de esta hoja y del documento de consentimiento firmado.

2. ¿Por qué se le pide participar?

Se le solicita su colaboración para llevar a cabo un **estudio descriptivo retrospectivo para ver la frecuencia/incidencia del polimorfismo UGT1A1*28 en pacientes que van a ser sometidos a tratamiento con irinotecan**. Se pide **autorización para el uso del excedente de muestras de ADN obtenidas en la sección de Genética del HUMS para su posterior estudio para validaciones/verificaciones de la técnica**. Esta información siempre será anónima e inidentificable.

3. ¿Cuál es el objeto de este estudio?

El objetivo principal es evaluar la implementación de un kit comercial inicialmente destinado para el diagnóstico de Síndrome de Gilbert para su aplicación en el estudio genético del polimorfismo UGT1A1*28: intolerancia al irinotecán y sus metabolitos en la práctica asistencial. Se pretende estimar la frecuencia del polimorfismo en heterocigosis y homocigosis en la población a estudio (pacientes que van a ser sometidos a tratamiento con irinotecan), para verificar la importancia de detectar la presencia de dicho polimorfismo antes de iniciar el tratamiento pudiendo ajustar las dosis evitando posibles efectos secundarios. ***El estudio formará parte del trabajo fin de grado de la estudiante María Mayoral Pallarés, tutorizada por la Dra. Silvia Izquierdo Álvarez, facultativo y Jefa de la Sección de Genética del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.***

4. ¿Qué riesgos o molestias supone? No se prevé ningún riesgo asociado para su persona durante el estudio al tratarse de un estudio meramente descriptivo.

5. ¿Obtendré algún beneficio por mi participación? Al tratarse de un estudio de investigación orientado a generar conocimiento no es probable que obtenga ningún beneficio por su participación si bien usted contribuirá al avance científico y al beneficio social. Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación.

6. ¿Cómo se van a tratar mis datos personales? Toda la información recogida se tratará conforme a lo establecido en la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal. En la base de datos del estudio no se incluirán datos personales: ni su nombre, ni su nº de historia clínica ni ningún dato que le pueda identificar. Se le identificará por un código que sólo el equipo investigador podrá relacionar con su nombre. Sus datos personales serán tratados exclusivamente para el trabajo de investigación al que hace referencia este documento. Sólo el equipo investigador tendrá acceso a los datos de su historia clínica y nadie ajeno al centro podrá consultar su historial.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos. Además, puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al promotor del estudio (Dra. Silvia Izquierdo Álvarez). Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

El tratamiento de los datos de este estudio queda legitimado por su consentimiento a participar. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido. En caso de que desee que se destruyan tanto los datos como las muestras ya recogidas debe solicitarlo expresamente y se atenderá a su solicitud.

Podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión y portabilidad de sus datos, de limitación y oposición a su tratamiento, de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (RGPD 2016/679) ante el investigador principal del proyecto, pudiendo obtener información al respecto dirigiendo un correo electrónico a la dirección dpd@salud.aragon.es. Podrá consultar información adicional y detallada en el Registro de Actividades de Tratamiento del Gobierno de Aragón, en el siguiente enlace: https://aplicaciones.aragon.es/notif_lopd_pub/details.action?fileId=731. Así mismo, en cumplimiento de los dispuestos en el RGPD, se informa que, si así lo desea, podrá acudir a la Agencia de Protección de Datos (<https://www.aepd.es>) para presentar una reclamación cuando considere que no se hayan atendido debidamente sus derechos. El tratamiento de sus datos personales se realizará utilizando técnicas para mantener su anonimato mediante el uso de códigos aleatorios, con el fin de que su identidad personal quede completamente oculta durante el proceso de investigación.

No se cederán datos a terceros salvo obligación legal. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

El promotor/investigador adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación o que se utilicen para fines ajenos a los objetivos de esta investigación.

A partir de los resultados del trabajo de investigación, se podrán elaborar comunicaciones científicas para ser presentadas en congresos o revistas científicas, pero se harán siempre con datos agrupados y nunca se divulgará nada que le pueda identificar

7. ¿Quién financia el estudio? Este proyecto no tiene financiación ni precisará ningún coste añadido.

8. ¿Se me informará de los resultados del estudio? Usted tiene derecho a conocer los resultados del presente estudio. También tiene derecho a no conocer dichos resultados si así lo desea. Por este motivo en el documento de consentimiento informado le preguntaremos qué opción prefiere. En caso de que desee conocer los resultados, el investigador le hará llegar los resultados.

9. ¿Puedo cambiar de opinión? Su participación es totalmente voluntaria, puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en su atención sanitaria. Basta con que le manifieste su intención al investigador/promotor del estudio.

Muchas gracias por su atención, si finalmente desea participar le rogamos que firme el documento de consentimiento que se adjunta.

9.2 Documento de consentimiento informado (para el paciente)

Título del PROYECTO: Validación de un kit comercial (diagnóstico del síndrome de Gilbert) para la determinación del polimorfismo UGT1A1*28 (intolerancia al irinotecan): evaluación de su implementación en la práctica asistencial.

Yo, (nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con:(nombre del Doctor que atiende al paciente)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi consentimiento para participar en este estudio que formará parte de un trabajo fin de grado y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos conforme se estipula en la hoja de información que se me ha entregado.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

9.3 Documento de consentimiento informado (para el investigador)

Título del PROYECTO: Validación de un kit comercial (diagnóstico del síndrome de Gilbert) para la determinación del polimorfismo UGT1A1*28 (intolerancia al irinotecan): evaluación de su implementación en la práctica asistencial.

Yo, (nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con:(nombre del Doctor que atiende al paciente)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi consentimiento para participar en este estudio que formará parte de un trabajo fin de grado y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos conforme se estipula en la hoja de información que se me ha entregado.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

9.4 Dictamen favorable CEICA



Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos

C.P. - C.I. PI22/004

23 de febrero de 2022

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 23/02/2022, Acta Nº 04/2022 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

Título: Validación de un kit comercial (diagnóstico del síndrome de Gilbert) para la determinación del polimorfismo ugt1a1*28 (intolerancia al irinotecan): evaluación de su implementación en la práctica asistencial.

Alumna: María Mayoral Pallarés

Tutora: Silvia Izquierdo Álvarez

Versión protocolo: VERSIÓN 2. 23 DE ENERO DE 2022

Versión documento de información y consentimiento: Versión 01, de fecha 20/02/2022

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la correcta obtención de los consentimientos informados, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ

Firmado digitalmente por
GONZALEZ HINJOS MARIA

HINJOS MARIA - - DNI

03857456B

DNI 03857456B

Fecha: 2022.02.24
15:40:25 +01'00'

9.5 Consentimiento informado estudio genético molecular

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REALIZACIÓN DE ESTUDIO DE GENÉTICA MOLECULAR

1. Que acepto voluntariamente que se me extraiga una muestra biológica (sangre y/o tejidos y/u otros líquidos biológicos) para la realización de un estudio de ADN/ARN para el diagnóstico de una enfermedad genética. Este estudio de ADN/ARN se realizará de forma confidencial y codificada. No me ocasionará más molestias que las propias de cualquier toma de muestra. Solo será utilizado para el diagnóstico y/o estudio de portador de

2. Que me han explicado la necesidad, intención y propósitos de la extracción de ADN/ARN para este diagnóstico y/o estudio.

3. He podido formular todas las preguntas que he creído convenientes para comprender estos estudios y me han aclarado todas las dudas planteadas.

4. Es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado concluyente acerca de la enfermedad debido a su complejidad genética.

5. El hecho de no encontrarse mutaciones en el gen/es estudiados **NO** excluye que yo pueda ser portador o afecto de la enfermedad.

6. Dichos estudios pueden prolongarse en el tiempo, hasta obtener el resultado y que en ocasiones puede requerirse más muestra del paciente y muestra de familiares directos para completar el estudio.

7. Que he sido informado de que los resultados obtenidos serán confidenciales y no serán transmitidos a terceros. En ocasiones puede requerirse muestra de familiares directos, en cuyo caso, se solicitará consentimiento y autorización expresa para la obtención de la muestra y realización del estudio pertinente a los mismos.

8. En cualquier momento puedo rehusar a proseguir con este estudio, sin que dicha renuncia suponga ningún perjuicio en el seguimiento o tratamiento que se realice de mi enfermedad.

9. Que comprendo que, mediante la realización de esta prueba, se pueden obtener hallazgos incidentales de información genética no relacionada con la sospecha clínica que inició el estudio. Que deseo ser informado de esos hallazgos incidentales, concretamente, de las variantes patogénicas o probablemente patogénicas que afecten a alguno de los genes seleccionados por el consenso de la comunidad científica.

(marcar con una "X" la opción deseada) Sí No

10. Que autorizo a que la muestra se derive a otros laboratorios designados por el Hospital Universitario Miguel Servet para ayudar en el proceso diagnóstico, siempre de acuerdo con las regulaciones legales y normas recogidas en este consentimiento informado.

(marcar con una "X" la opción deseada) Sí No

11. Que entiendo que el estudio de los resultados de esta prueba puede contribuir a mejorar su análisis y al conocimiento científico. Por ello, autorizo a que el excedente de mis muestras, los datos clínicos y los resultados obtenidos puedan usarse para estudios de calidad (controles de calidad internos) y de mejora de técnicas (validaciones/verificaciones), investigación o bases de datos. Esta información será siempre anónima e inidentificable, y toda información personal será siempre eliminada.

(marcar con una "X" la opción deseada) Sí No

12. En el caso de que no pudiera acudir a recoger o recepcionar el resultado de mis estudios, autorizo a mi familiar (indicar NOMBRE Y APELLIDOS y relación de parentesco):

Podré ejercer mis derechos de acceso, rectificación, supresión y portabilidad de mis datos, de limitación y oposición a su tratamiento, de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (RGPD 2016/679) ante el responsable del laboratorio de genética del Hospital Universitario Miguel Servet, pudiendo obtener información al respecto dirigiendo un correo electrónico a la dirección dpd@salud.aragon.es

DECLARACIONES Y FIRMAS

Etiqueta

Don/doña:
Fecha de nacimiento: ___ N°
Historia: Afiliación:
.....
Domicilio:.....
Teléfono:

Declaro:

Que el Dr./Dra.: (nombre y apellidos del facultativo que proporciona la información) me ha informado de la necesidad/conveniencia de realizar un **ESTUDIO DE GENÉTICA MOLECULAR**, y se me ha explicado y he aceptado y comprendido la información que se me ha dado. El facultativo que me ha atendido es quien me ha facilitado las explicaciones en lenguaje claro y sencillo y he comprendido el procedimiento, así como sus riesgos y complicaciones más frecuentes, tanto de tipo general como derivados de mi situación concreta.

He sido, así mismo, informado/a de las posibles alternativas, he podido formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado las dudas planteadas.

Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.

En consecuencia, **doy mi consentimiento** para que se me realice la intervención que me ha sido explicada anteriormente.

En Zaragoza, a _____ de de

Firma del paciente:

Firma del
médico

TUTOR LEGAL O FAMILIAR

D./Dña. _____ con DNI. _____ y en calidad de _____
....., soy consciente de que el paciente cuyos datos figuran en el encabezamiento, no es competente para decidir en este momento, por lo que asumo la responsabilidad de la decisión.

He sido suficientemente informado/a del procedimiento **ESTUDIO DE GENÉTICA MOLECULAR** que se le va a realizar y doy expresamente mi consentimiento para su realización, que podré retirar en el momento que lo desee.

Firma del tutor o representante legal

.....

NO AUTORIZACIÓN / ANULACIÓN

Por la presente **NO AUTORIZO / ANULO** cualquier consentimiento plasmado en el presente impreso, que queda sin efecto a partir de este momento. Me han sido explicadas, y entiendo y asumo las repercusiones que sobre la evolución del proceso ello pudiera derivar.

En Zaragoza, a de de

Firma del paciente o representante legal

.....

Información básica sobre protección de datos en cumplimiento del deber de información dispuesto en el RGPD 2016/679:

Responsable: Servicio Aragonés de Salud

Finalidad: Gestión de Consentimientos Informados de Historia Clínica del Servicio Aragonés de Salud

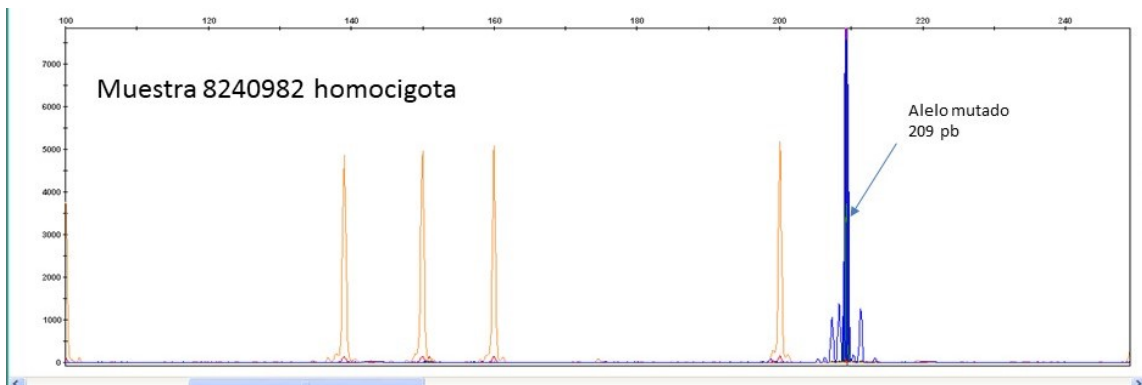
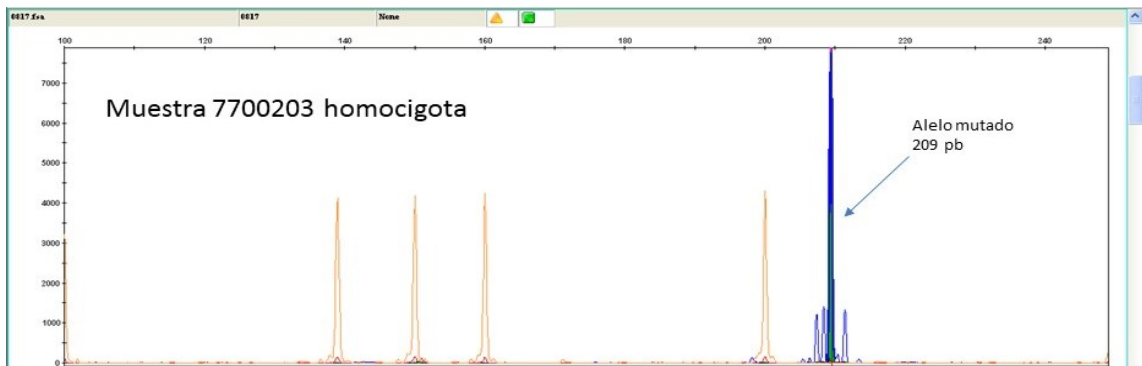
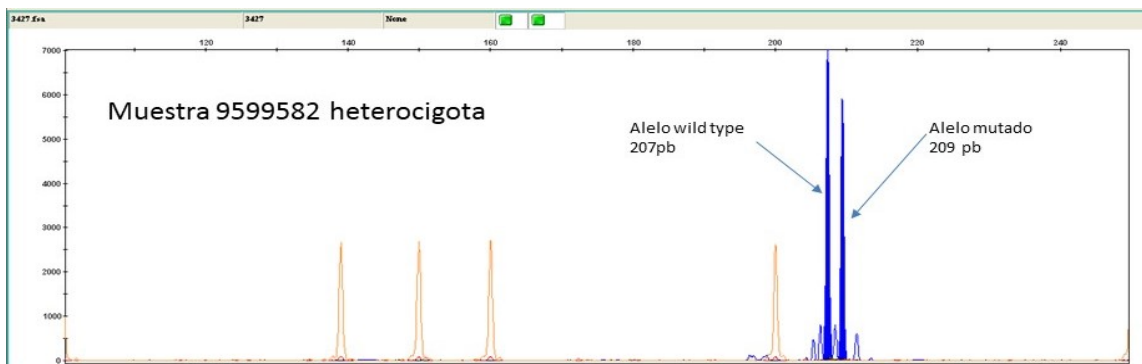
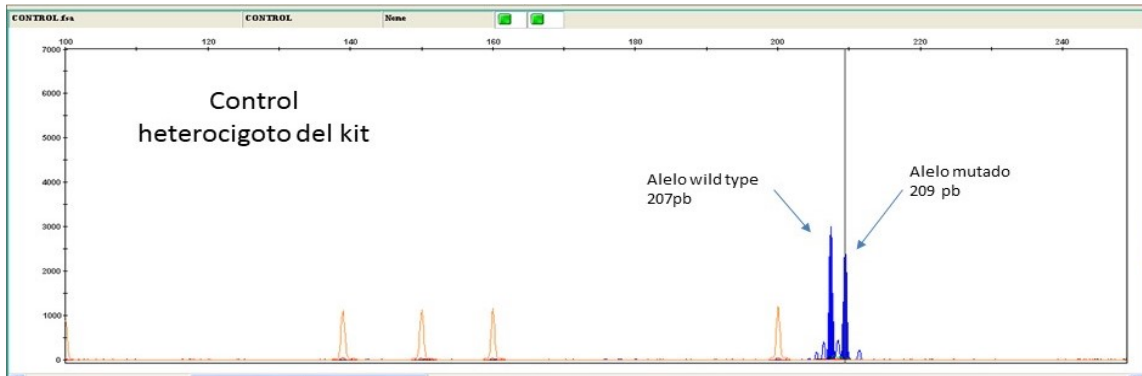
Legitimación: Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, LOPD, RGPD

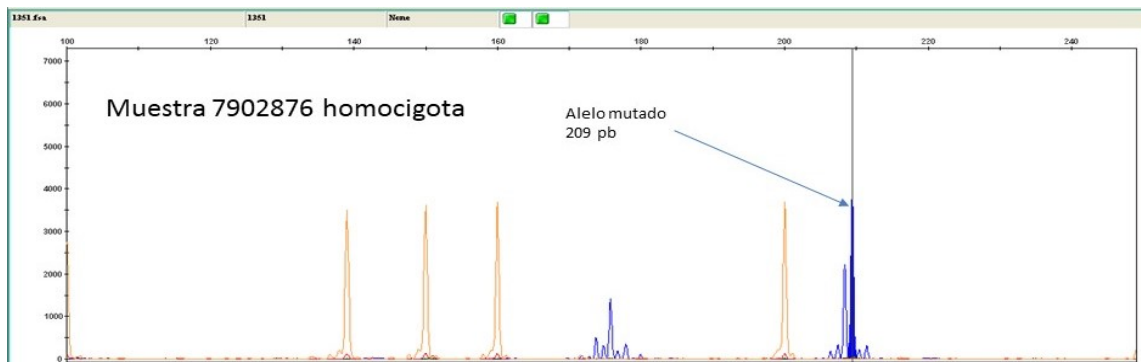
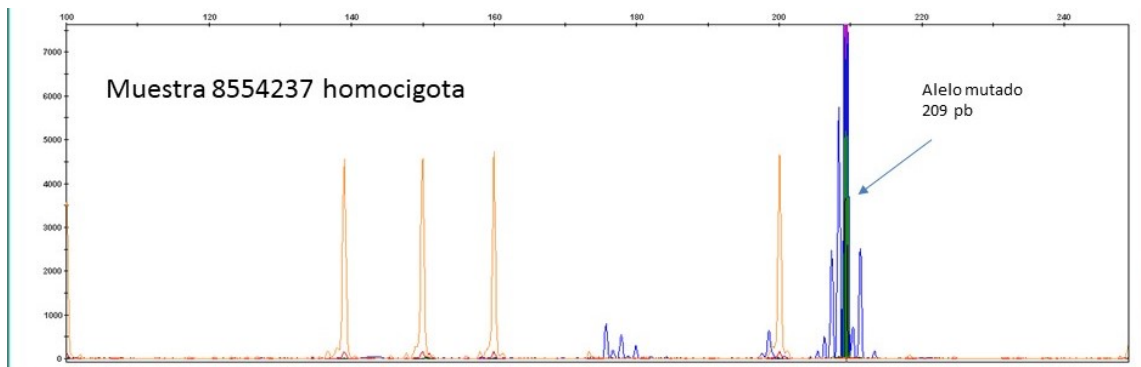
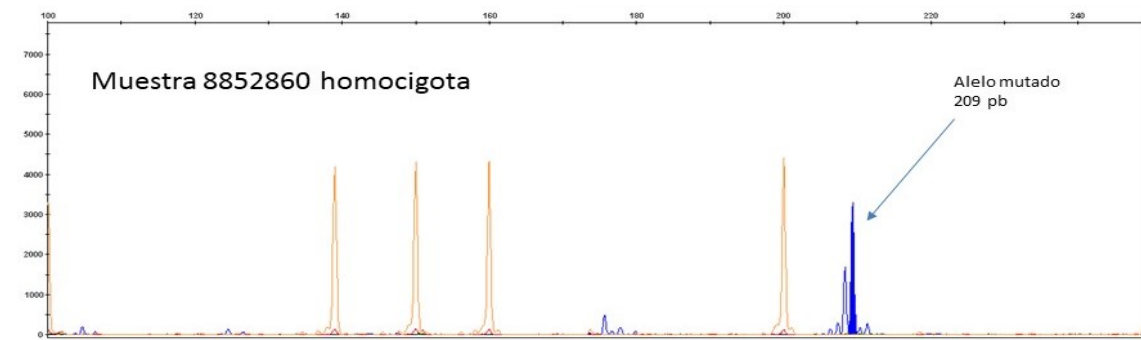
Destinatarios: No se cederán datos a terceros, salvo obligación legal

Derechos: Acceder, rectificar y suprimir los datos, así como otros derechos, como se explica en la información adicional **Información adicional:**

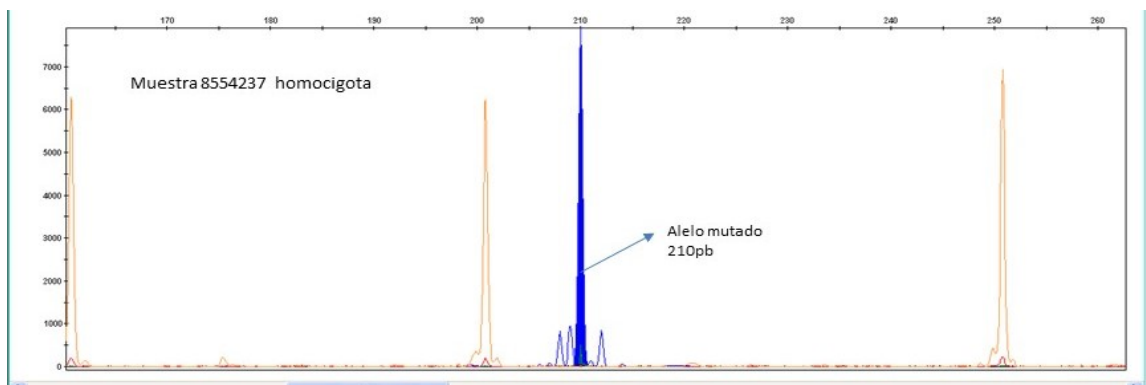
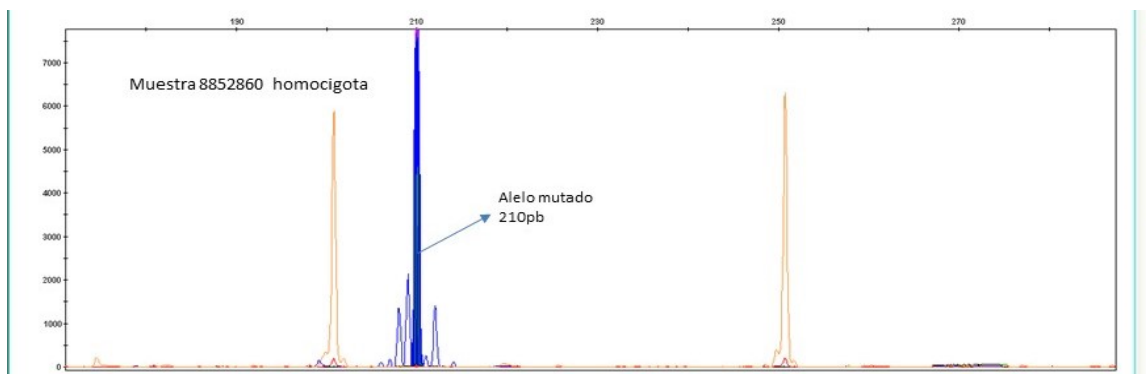
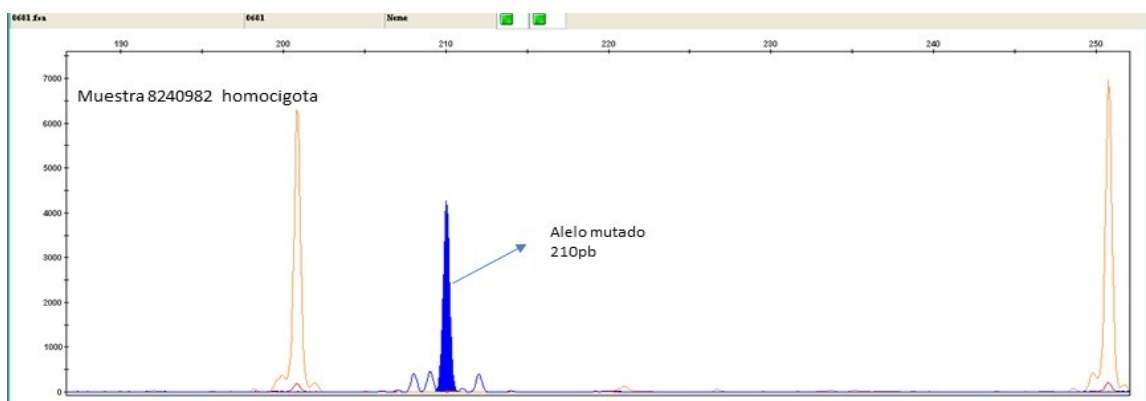
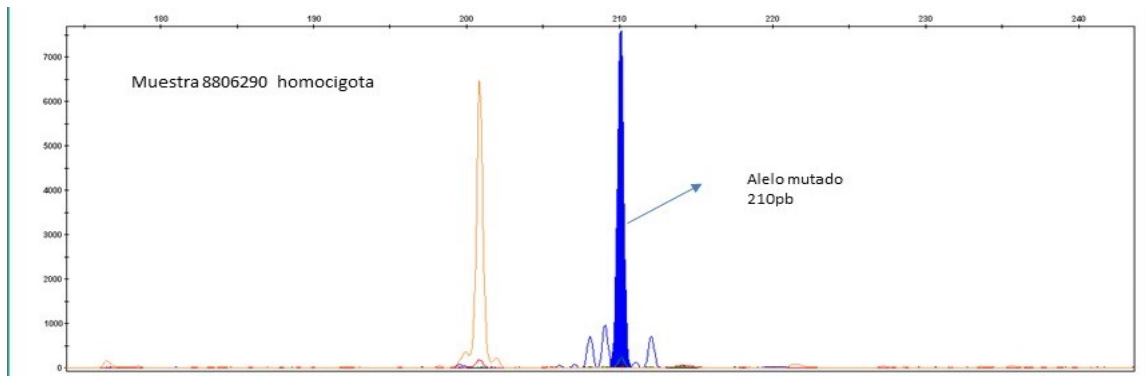
Puede consultar información adicional y detallada sobre Protección de Datos en nuestra web: www.aragon.es/seguridadsalud

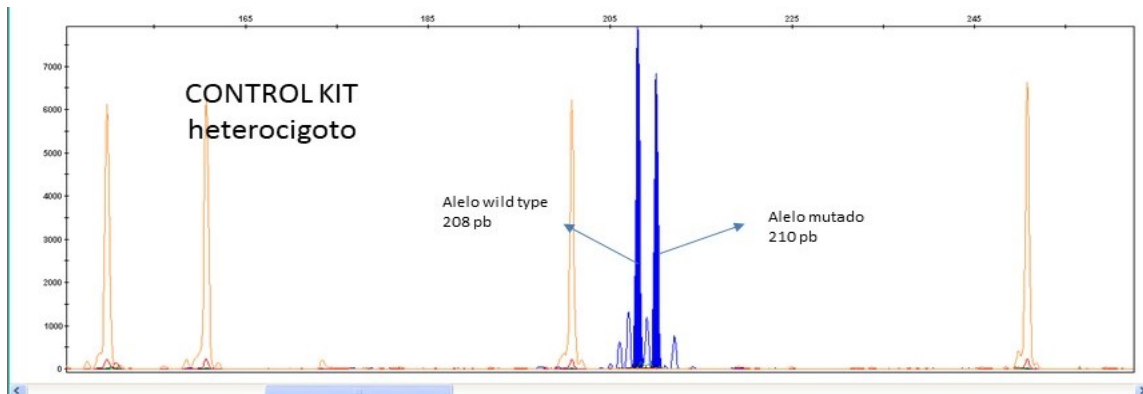
9.6 Electroferogramas resultados día 05/10/2021



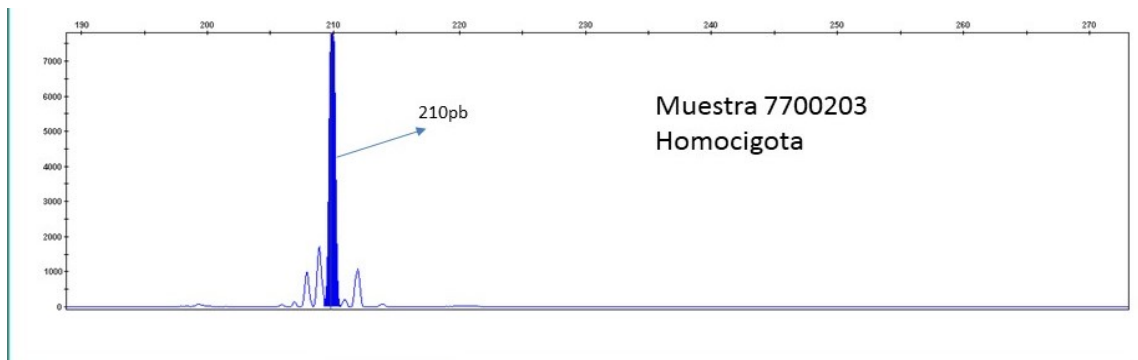
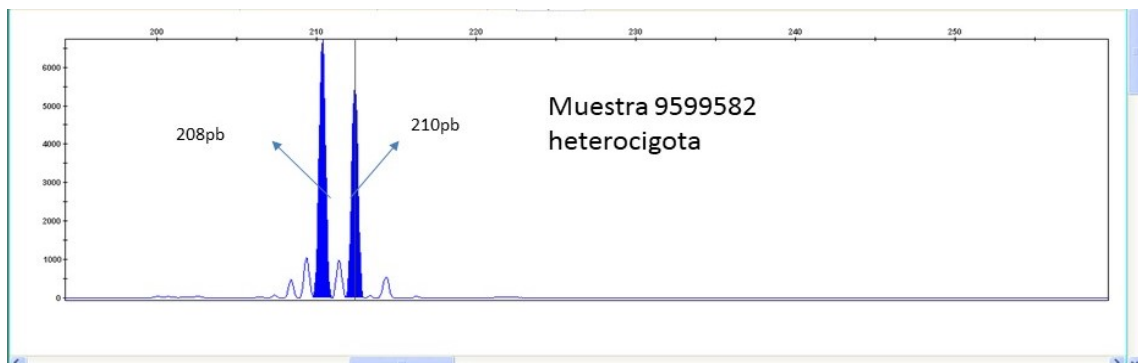
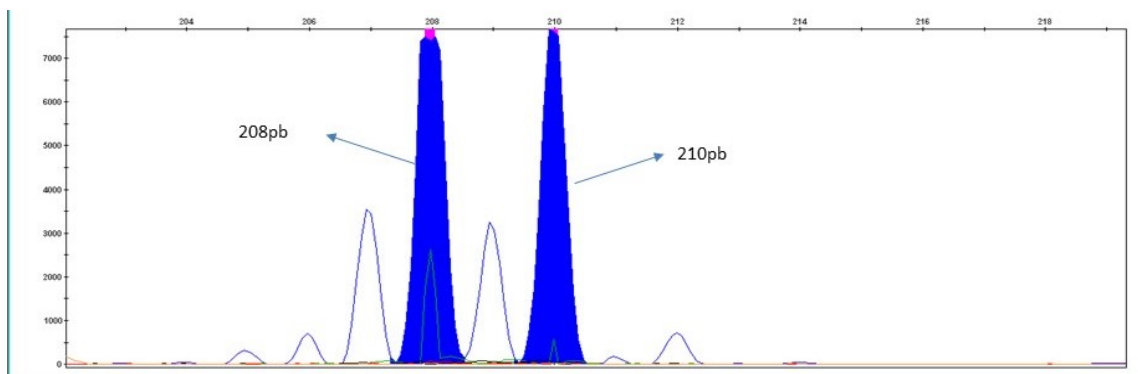


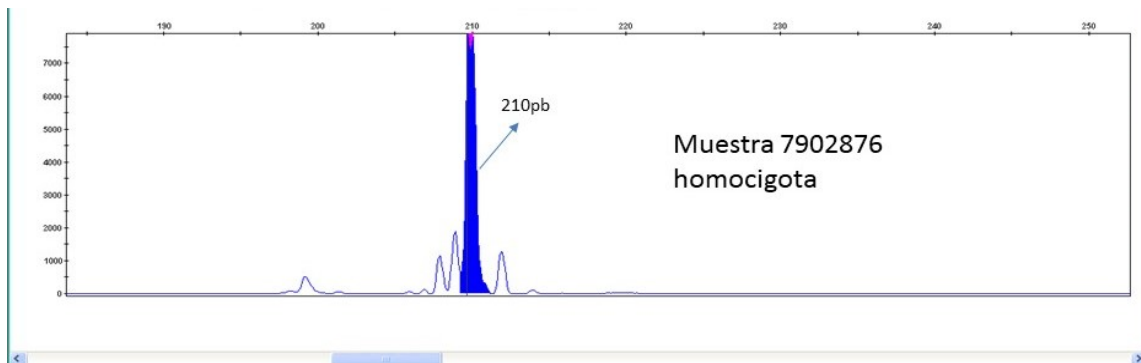
9.7 Electroferogramas resultados día 07/10/2021



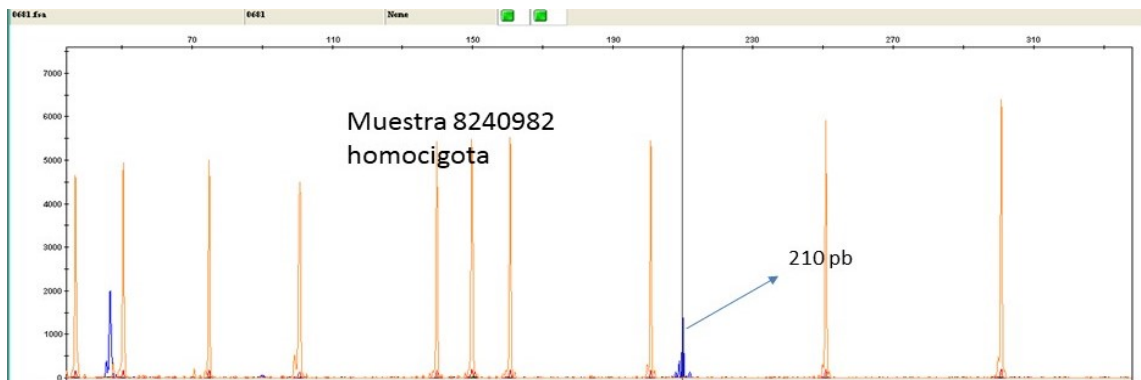


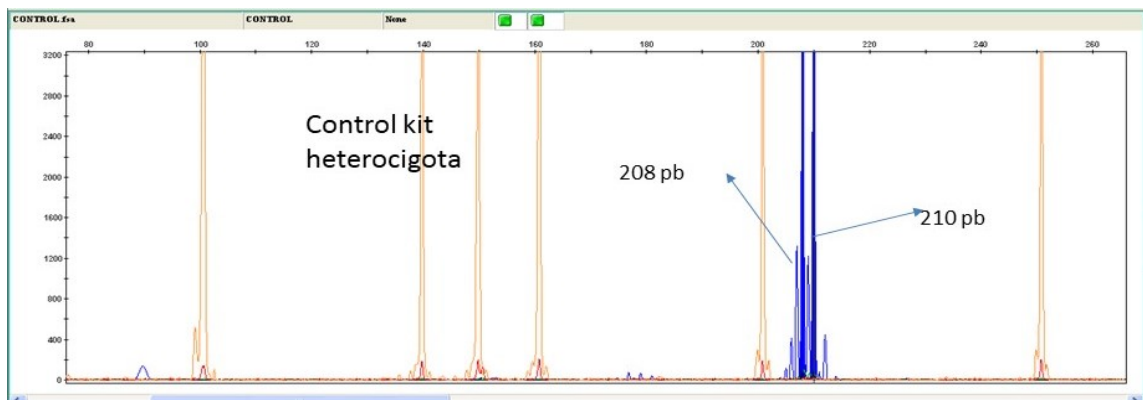
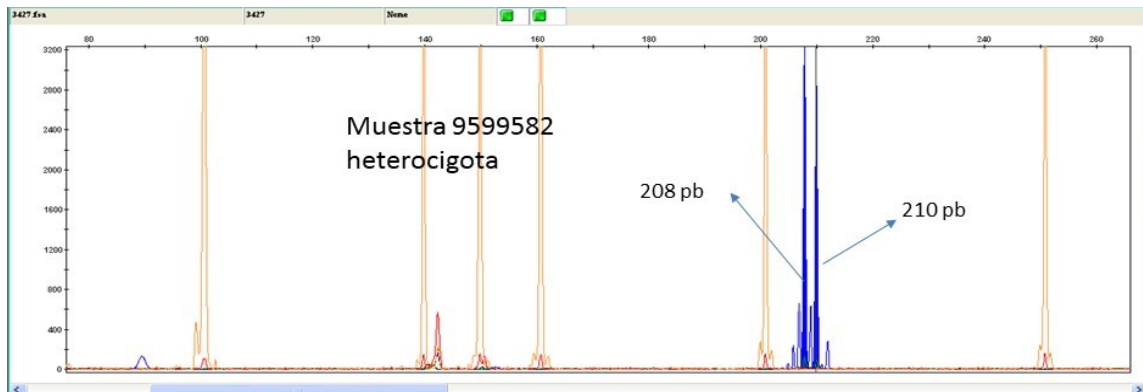
9.8 Electroferogramas resultados día 13/10/2021



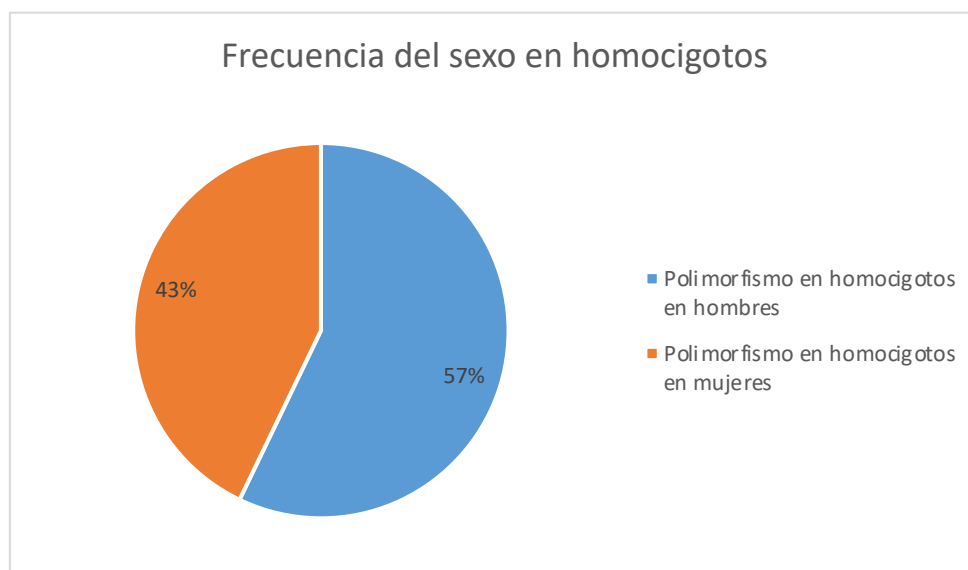


9.9 Electroferogramas resultados día 15/10/2021

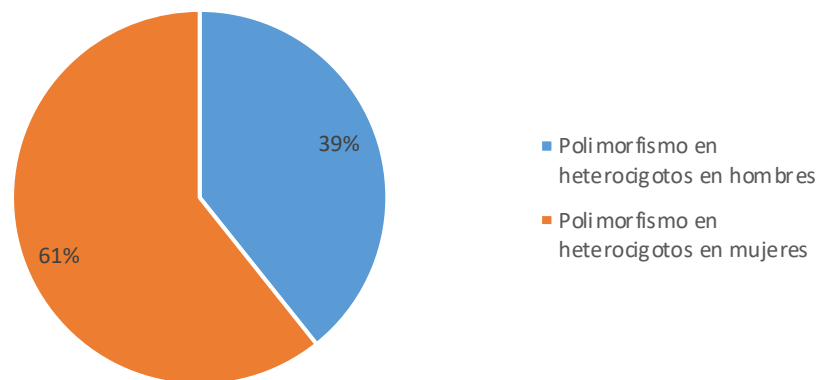




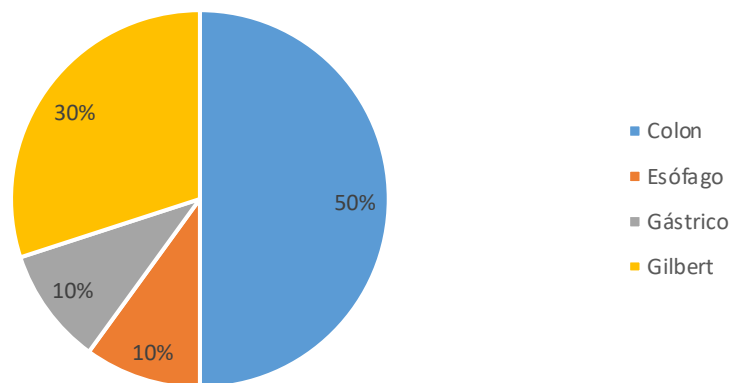
9.10 Gráficas extras: Apartado 4.2 Evaluación de su implementación en la práctica asistencial



Frecuencia del sexo en heterocigotos



Cáncer/Síndrome Gilbert en homocigotos



Cáncer/Síndrome Gilbert en heterocigotos

