

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

***“IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN UN SOLO  
NUCLEÓTIDO EN EL GEN CYP2D6 DEL CITOCROMO  
P450, EN POBLACIÓN SANA DEL ECUADOR”***

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**GUADALUPE NATALIA HERAS MOSQUERA.**

**Sangolquí, 24 de septiembre del 2010.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de alguna forma a la realización de esta Tesis:

Al Director del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador y Director del presente proyecto de Tesis, Doctor Edmundo Estévez, por su esfuerzo, dedicación, y por su gran apoyo durante todo este tiempo.

Al Doctor Marcelo Grijalva, por su gran contribución, asesoramiento y ayuda en la realización de esta Tesis.

Al Doctor Enrique Terán y al Doctor Adrián Llerena, ya que sin su ayuda no se hubiera podido llevar a cabo el presente proyecto de Tesis. A ellos nuevamente muchas gracias.

A Marcita y María Augusta por su colaboración en la realización de los estudios de la presente Tesis, por las largas horas de trabajo en el laboratorio, así como su compañerismo y amistad.

A todos los voluntarios que han participado, sin cuya colaboración no hubiera sido posible la realización de los estudios de esta Tesis.

A mis padres y hermanos, ya que su apoyo diario durante todos estos años ha sido muy importante para mí.

Y a Stalin, por saber esperar y estar siempre ahí.

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. GUADALUPE NATALIA HERAS MOSQUERA, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

Quito, 24 de septiembre de 2010

---

Dr. Edmundo Estévez  
DIRECTOR

---

Dr. Marcelo Grijalva  
COORDIRECTOR

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Dolores, cuya fuerza, tenacidad y constancia me han enseñado a tener fortaleza para continuar hacia adelante en las circunstancias que la vida me presente.

A mi padre, Antonio y mis hermanas Hilda y Gladys por darme apoyo constante durante mis años de estudios.

A Stalin y mi querida hija Sofía.

**Guadalupe Natalia Heras M.**

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Introducción

Es conocido que entre los seres humanos existe una similitud del 99,9 % en su código genético, es en este 0,1 % restante que se manifiestan todas las diferencias que nos caracterizan como individuos. Entre los rasgos que nos caracterizan podemos encontrar diferencias en el color de los ojos, cabello y piel entre otros. Estas diferencias, que no solo se manifiestan en características que podemos apreciar a simple vista desde el exterior, también derivan en alteraciones en el funcionamiento de órganos internos, metabolismo y fisiología.

Los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP por sus siglas en inglés -Single Nucleotide Polymorphisms) están presentes a lo largo del genoma humano con un espaciamiento promedio de  $1.5 \times 10^6$  bases que representa aproximadamente  $2 \times 10^6$  en todo el genoma. En la actualidad se cuenta con un mapa de alrededor de 1.4 millones de SNP a lo largo del genoma, de los cuales 60,000 se encuentran dentro de regiones codificantes o exones. Lo cual representa alrededor del 3% del total del genoma. La diversidad nucleotídica de SNP en el genoma humano genera posibles haplotipos relacionados con rasgos bioquímicos o patológicos (Tusié Luna, 2001).

En humanos, el mejor ejemplo estudiado de polimorfismos genéticos en la fase I del metabolismo de drogas es la debrisoquina 4 – hidroxilasa o Citocromo P450 (*CYP2D6*). Esta enzima cataliza el metabolismo oxidativo de

alrededor del 25% de drogas clínicamente importantes, incluido muchos antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, entre otros (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).

## **I.2 Formulación del Problema**

Los polimorfismos del *CYP2D6* o debrisoquina hidroxilasa fueron descubiertos en el año 1970 por dos grupos de investigadores al mismo tiempo, Mahgoub et-al. y Eichelbaum et-al., descubriendo posteriormente que el metabolismo de las drogas debrisoquina y esparteína puede ser afectado por un defecto genético común en la enzima debrisoquina hidroxilasa (actualmente llamada *CYP2D6*) en población caucásica (Llerena, Dorado, & Peñas Lledó, 2009).

El gen *CYP2D6* se localiza en el cromosoma humano 22, en la posición 22q13.1 y normalmente consiste de un gen activo y dos pseudogenes. El gen *CYP2D6* es altamente polimórfico y han sido identificadas alrededor de 50 variantes alélicas diferentes (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).

La proteína *CYP2D6* se expresa en varios tejidos, incluyendo hígado, riñón, cerebro, placenta, mama y pulmón.

El polimorfismo genético de esta enzima origina distintos subgrupos de individuos en la población: Metabolizadores ultrarrápidos (UM), metabolizadores intermedios (IM) y metabolizadores lentos o pobres (PM), que difieren en la

capacidad para llevar a cabo una cierta reacción de oxidación (Alanis et-al., 2007). Por esta razón se considera que la clonación y caracterización de CYP2D6 fue un logro clave que dio inicio a la farmacogenética molecular.

La frecuencia del fenotipo PM difiere de acuerdo al grupo étnico, es así que se presenta en el 5% – 10% de la población caucásica, en africanos la frecuencia es del 0 al 19%, mientras que en asiáticos no es mayor al 1% (Alanis et-al., 2007). Además en población hispana, existen muy pocos estudios, los que más resaltan son los llevados a cabo en población mexicana, afroamericanos, cubanos, colombianos y nicaragüenses, donde se observa que el porcentaje de PM varía mucho de acuerdo al origen étnico.

### **I.3 Justificación del Problema:**

Es por todo lo anterior y además por el hecho de que en Ecuador no existen estudios de polimorfismos genéticos en el gen *CYP2D6*, que se planea realizar la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido del gen que codifica para la enzima *CYP2D6* en población ecuatoriana sana, particularmente de los alelos *CYP2D6\*2*, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*35*, *CYP2D6\*41*.

La individualidad en el metabolismo de drogas en la actualidad no es únicamente de interés académico sino también farmacéutico, ya que el conocimiento de cómo una droga es metabolizada, así como de cuantas enzimas están involucradas en el metabolismo de las mismas y cuán rápido un paciente puede metabolizar una droga específica, puede ser una herramienta

muy útil, para predecir la dosis personalizada de drogas, especialmente para los fenotipos PM y UM en individuos (Bertilsson et-al., 2002).

El presente estudio está relacionado directamente con el área de Biotecnología Humana, buscando realizar con esta investigación un aporte directo al campo de la salud y tratar de satisfacer necesidades médicas justificadas y actuales. Además con los resultados de esta investigación se pretende crear una base de datos que permita conocer la variabilidad genética en los ecuatorianos, en este caso específicamente determinar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *CYP2D6* a nivel poblacional.

Debido a que en la población ecuatoriana no existen datos de investigaciones realizadas para determinar la prevalencia de polimorfismos se propone estudiar polimorfismos de un solo nucleótido en el gen que codifica para la enzima *CYP2D6* en individuos ecuatorianos en una población seleccionada y con ello iniciar una base de datos sobre tipos de metabolizadores en nuestra población.

El conocimiento generado del estudio de polimorfismos genéticos en el gen *CYP2D6* contribuirá a elucidar cómo varía éste entre cohortes de pacientes y en particular, la importancia de estas variaciones en las respuestas a los fármacos. Esto constituirá uno de los estudios pioneros en el campo de la Farmacogenética en el Ecuador.



## **I.4 Objetivos de la Investigación**

### **I.4.1 Objetivo General del Proyecto**

- Determinar la prevalencia de Polimorfismos de un Solo Nucleótido en el gen que codifica para la enzima Debrisoquin Hidroxilasa o *CYP2D6*, en un grupo seleccionado de voluntarios sanos ecuatorianos.

### **I.4.2 Objetivos Específicos**

- Determinar las frecuencias genotípicas del *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos.
- Desarrollar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP's) para la determinación de variantes alélicas del gen *CYP2D6*.
- Determinar la frecuencia de los alelos *CYP2D6\*1* (wild type o silvestre), *CYP2D6\*2*, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*35* y *CYP2D6\*41* en un grupo de voluntarios ecuatorianos sanos, mayores de 18 años.

- Comparar si la frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *CYP2D6* en la población ecuatoriana seleccionada es similar a la encontrada en la población hispánica (10%).

## **I.5 Marco Teórico**

“La oportunidad actual de secuenciar, analizar y comparar el genoma completo de organismos vivos es de fundamental importancia, para una mejor comprensión tanto de la biología humana como de la medicina. La secuencia genómica humana es un registro formidable único, que nos permite saber quiénes somos y cómo nos desarrollamos como especie. El conocimiento generado como consecuencia del estudio del genoma contribuirá a elucidar cuáles características son propias y cuáles son adquiridas en nuestra especie, así como la interacción entre la herencia y el medio ambiente” (Chavarría et-al., 2002).

### **I.5.1 Polimorfismos**

El genoma es la unidad fundamental de los seres humanos. Se ha podido demostrar que todos los individuos compartimos aproximadamente el 99.9% del código de nucleótidos en nuestro genoma, sin importar grupo étnico o lugar de procedencia. Es por este motivo que resulta sorprendente que la diversidad de los seres humanos en el ámbito genético, esté dada por una variación menor al 0.1% en nuestro Acido Desoxirribonucleico (ADN) (Chavarría et-al., 2002). Es decir la diferencia de ADN entre un individuo y otro es de

alrededor de 3 millones de pares de bases, las mismas pueden estar expresadas no solo en la secuencia de los genes en sí mismo, sino también en el procesamiento diferente en la formación de proteínas.

En términos científicos, el polimorfismo se define como “la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado” (Torrades, 2002). Los alelos son variaciones de la secuencia del ADN presentes en una posición definida (locus) en un cromosoma.

Consecuentemente, en una célula diploide cada locus está ocupado por dos alelos, uno de origen materno y otro de origen paterno, situados en sendos cromosomas homólogos. La variabilidad genética se origina ya durante el proceso de la morfogénesis, es decir, desde el cigoto, durante el desarrollo de los tejidos, transformación en órganos y también durante la vida del individuo (Torrades, 2002). Es decir los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones.

Se ha estimado que hay una variante en cada 1.000 pares de bases de los 3.000 millones que configuran el genoma humano. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Guttmacher et-al., 2002).

Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de “alta penetrancia”, ya que los

portadores de la variante pueden manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Las variantes antes mencionadas suelen ser de baja frecuencia en la población general, por ejemplo, las mutaciones heredadas en el gen supresor de tumores APC determinan la aparición de la poliposis familiar adenomatosa que a menudo degenera en carcinomas en el colon, pero esta entidad no explica más de un 1% del total de tumores de colon (Iniasta et-al., 2005).

En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad, a estos se los llama polimorfismos de “baja penetrancia”. También se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad; y para que dicha variante genética se exprese a menudo es necesaria la exposición a factores ambientales (Porta, 2003).

Un ejemplo son las variantes nulas, llamadas así porque anulan la función en genes que codifican enzimas glutatión-S-transferasas (GSTT1, GSTM1). Los individuos fumadores y portadores de la variante nula podrían tener un riesgo aumentado de padecer cáncer de pulmón o de vejiga, posiblemente por ser incapaces de metabolizar los carcinógenos del tabaco (McWilliams, 1995 & Hung, 2004), aunque estos hallazgos no siempre son consistentes (Benhamou, 2002).

## **I.5.2 Polimorfismos de un Solo Nucleótido**

Los Polimorfismos más frecuentes son los de posición en una única base en el ADN genómico en el que un nucleótido tiene una diferente secuencia alternativa y son llamados Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP; por sus siglas en inglés de Single Nucleotide Polymorphism), estos están presentes en individuos normales en una población dada y en el cual el alelo más frecuente tiene una abundancia igual o menor al 1%. La mayoría de las variaciones son los SNP que involucran simples sustituciones de bases, el resto de ellas son inserciones o deleciones. Expresado esto último de manera simple, un SNP es la sustitución de una base de purina o pirimidina en un lugar preciso de la hebra de ADN (Collins & Mckusick, 2001).

Un SNP se detecta por secuenciación de una región particular de diferentes individuos, quienes pueden ser idénticos (homocigotos: T/T o C/C) o diferentes (heterocigotos T/C) en el mismo sitio polimórfico. Un SNP puede ser bi, tri o tetraalélico, aunque generalmente en el ser humano solo se observan SNP bialélicos (sólo existen dos alternativas en un sitio determinado). Una secuencia de ADN es una combinación lineal de cuatro nucleótidos, al comparar dos secuencias, posición por posición, donde se entrecrucen diferentes nucleótidos en la misma posición encontraremos un SNP. Esto puede significar diferencias en la susceptibilidad a, en la protección de, o en la respuesta a; de allí nace el potencial en medicina (González, 2006).

Los polimorfismos de un solo nucleótido pueden afectar la función de un gen o pueden ser neutros. En ocasiones esta neutralidad se infiere si un SNP no altera la codificación de proteínas; sin embargo, en la práctica clínica esta inferencia puede ser equivocada. Es importante señalar que un SNP puede ser responsable de un fenotipo anormal solamente en el contexto de un ambiente determinado, sin el cual el fenotipo anormal no se expresa (Risch, 2000).

Cuando se anunció el programa del genoma humano, se habían identificado aproximadamente 300,000 SNPs, cifra que aumentó a más de 2,000,000 a finales del año 2000 (Collins & Mckusick, 2001).

A continuación se describen algunos datos sobre SNP:

- Hay descubiertos 1 419.190 SNPs en 2.7Gb del genoma.
- Hay un SNP por cada 1.91 kb de secuencia génica.
- 60.000 SNPs se encuentran en las regiones codificantes o exones.
- El 90% de una secuencia de 20 kb tendrá 1 o más SNP.
- El 93% de los genes contienen un SNP, de ellos el 98% esta distribuido en fragmentos de 5kb.
- En los exones hay 7.51 SNPs por cada 10 kb.
- En los cromosomas autosómicos la variación va entre 5.19 SNPs (en el cromosoma 21) a 8.79 (en el cromosoma 15) por cada 10 kb.
- En el cromosoma X la frecuencia es de 4.69 SNPs por cada 10 kb.
- En el cromosoma Y la frecuencia es de 01.51 SNPs por cada 10 kb (González, 2006).

Al comparar los cromosomas de dos individuos seleccionados al azar, es muy posible encontrar una variación por cada 1-250 nucleótidos. Estas variaciones pueden presentarse entre exones, con y sin cambios en la codificación del aminoácido, variaciones denominadas sinónimas y no sinónimas, o bien pueden presentarse en las regiones intrónicas o intergénicas del genoma (Chavarría et-al., 2002).

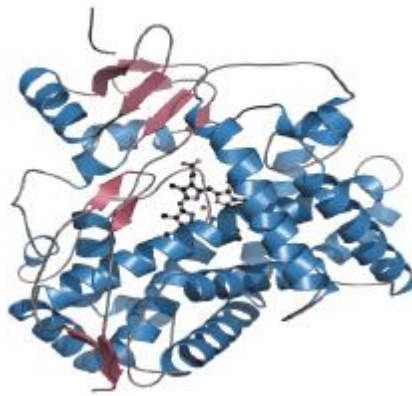
En la actualidad se dispone del análisis completo de varios millones de variaciones en el genoma humano, con una localización precisa de los

nucleótidos en grupos de individuos etnogeográficamente diferentes (Venter et-al., 2001)

### **I.5.3 Complejo Enzimático Citocromo P450**

El Citocromo P450 es una familia de hemoproteínas que catalizan distintas reacciones de oxido reducción en fase I de un gran número de compuestos tanto endógenos como exógenos, estos últimos llamados comúnmente xenobióticos. El nombre de Citocromo P450 se debe a que estas proteínas cuando son reducidas en presencia de CO, producen un espectro de absorción con un máximo de 450nm. Los Citocromos P450 se encuentran ubicados en las membranas del retículo endoplasmático liso de diferentes tejidos, principalmente en el hígado, aunque también se encuentran en testículos y glándulas adrenales (Guengerich et-al., 1993). Son monoxigenasas de función mixta y su actividad requiere un agente reductor NADPH y oxígeno molecular.

En la reacción típica la molécula de oxígeno es consumida (reducida) por cada molécula de sustrato. Un átomo de oxígeno se une a dos de hidrógeno, formándose una molécula de agua (Rang et-al., 1999). En este proceso intervienen dos enzimas: el citocromo P450-NADPH reductasa (que actúa como transportador de electrones) y el citocromo P450 que lleva a cabo la reacción en el sustrato.



**Figura I.1** Estructura general de las isoenzimas del Citocromo P450. El esquema de cintas corresponde a la estructura del *CYP2D6* donde marcados en azul y rojo se encuentran las estructuras  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada de la apoproteína, respectivamente, y en la región media se observa el grupo prostético heme con un átomo de hierro al centro del anillo porfirínico. El sitio de unión al sustrato no aparece esquematizado en la figura, sin embargo, debe localizarse próximo al grupo heme (Soucek & Gut, 1992).

Todas las enzimas, de cualquier especie, pertenecientes a esta superfamilia se identifican con el prefijo "CYP". En este sistema todas aquellas enzimas que tengan 40% ó más de homología en secuencia de aminoácidos se agrupan en una misma familia que se identifica con un número arábigo. Si un grupo de enzimas posee más del 55 % de homología, entonces se agrupa en una subfamilia que se representa con una letra capital. Finalmente, un número arábigo después de la letra identifica a una proteína individual y su gen correspondiente lleva el mismo código pero en itálicas. Así, el *CYP2D6* pertenece a la familia 2, subfamilia D y es codificado por el gen *CYP2D6* (Gordillo, 2008).



**Tabla I.1:** Porcentaje de las principales citocromos P450 presentes en el hígado y el porcentaje de participación de estos en el metabolismo de fármacos (Shimada et-al., 1994).

<i>CYP</i>	<i>Abundancia en el Hígado (%)<sup>a</sup></i>	<i>Variabilidad Interindividual<sup>b</sup></i>	<i>Expresión</i>	<i>Metabolismo de Fármacos (%)<sup>c</sup></i>
1A2	10	30	Inducible, polimórfico	4
2A6	5	100	Polimórfico	<1
2B6	1	50	Inducible	<1
2C8	<1	30	Polimórfico	<1
2C9	15	30	Polimórfico	11
2C19	4	30	Polimórfico	6
2D6	4	200	Polimórfico	25
2E1	10	50	Inducible, polimórfico	4
3A4	30	80	Inducible, polimórfico	50
3A5	<1		Inducible, polimórfico	<1

a: Estimación del contenido relativo en hígado de cada enzima P450 con respecto al P450 total.

b: Variabilidad de los niveles de cada enzima en el hígado de diferentes individuos.

c: Estimación de la participación de cada enzima en el metabolismo de fármacos en el hombre.

En humanos, de los más de 50 *CYP* conocidos, solo tres familias de enzimas (*CYP1*, *CYP2* y *CYP3*), pueden tener una contribución relevante en el metabolismo de fármacos y de xenobióticos (Wrighton y Stevens 1992, Gonzáles 1992; Cholerton et-al., 1999; Hasler, 1999 y Dorado, 2003). Numerosas isoenzimas de estas familias presentan una variabilidad interindividual en su familia catalítica, debido principalmente a influencias genético-ambientales (*CYP1A1*, *1A2*, *2A6*, *2C19*, *2D6*, *2E1*, *3A4* Y *3A5*), entre ellas una de las más estudiadas debido a su participación en el metabolismo de diferentes fármacos es la isoenzima *CYP2D6*.

### **I.5.3.1 Clasificación del Citocromo P450.**

En 1987 se establecieron los principios del sistema de nomenclatura y clasificación que se utiliza hoy en día, el cual obedece a criterios filogenéticos y se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas de las diferentes enzimas (Nebert et-al., 1987). Según este criterio, los P450 se identifican con las siglas CYP seguida de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que se corresponde con el gen (p. e. *CYP1A1*, *CYP2C9*). En una misma familia se agrupan aquellos enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud mayor del 40%, independientemente de la especie de procedencia. Dentro de una familia los P450 se agrupan en diferentes subfamilias que, siempre que haya más de una, se denominan correlativamente empezando siempre por la letra A (p. e. *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C*, etc).

En este caso, el requisito para que dos P450 pertenezcan a la misma subfamilia es que tengan una homología en la secuencia de aminoácidos superior al 55%. Por último, dentro de la misma subfamilia, los enzimas individuales se designan según números empezando siempre por el 1 (p. e. *CYP1A1*, *CYP1A2*), teniendo en cuenta que dos P450 se consideran como diferentes siempre y cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3%.

En el caso concreto del hombre se han secuenciado 57 genes y 47 pseudogenes pertenecientes a 18 familias. Los pseudogenes son genes defectuosos que no originan proteínas funcionales y que se consideran como

una reminiscencia de duplicaciones de genes en los que una de las copias ha degenerado y perdido su función (Nebert et-al., 1987).

En la Tabla I.2 se muestra los principales *CYPs* y sus sustratos, en donde se puede observar que la mayoría de estos fármacos están metabolizados, como mínimo en parte, por el *CYP2D6* (Crescenti, 2007).

**Tabla I.2:** Principales *CYPs* y sus Sustratos.

Isoenzima CYP	Fármaco AP	Evidencia In vitro	Evidencia In vivo
<i>CYP2D6</i>	Bromoperidol	SI/NO	NO
	Clorpromazina	SI	ND
	Clozapina	SI/NO	SI/NO
	Haloperidol *	SI	SI
	Olanzapina	SI	NO
	Perfazina *	SI	SI
	Risperidona*	SI	SI
	Tioridazona*	SI	SI
	Zuclopentixol	ND	SI
	Quetiapina	SI	NO
	Zotepina	SI	ND
	<i>CYP1A2</i>	Clorpromazina	SI
Clozapina*		SI	SI
Haloperidol		NO	SI
Olanzapina*		SI	SI/NO
Perfenazina		SI	ND
Tioridazona		ND	SI
Zopatina		SI	ND

<b>CYP2C9</b>	Perazina	SI	ND
<b>CYP2C19</b>	Clozapina	SI/NO	NO
<b>CYP3A4</b>	Perfenazina	SI	ND
	Bromperidol*	SI	SI
	Clozapina	SI	SI/NO
	Perazina	SI	ND
	Perfenazina	SI	ND
	Quetiapina*	SI	SI
	Risperidona*	SI/NO	SI
	Ziprasidona	SI	SI
	Zotepina	SI	ND

**\*Indica principal fármaco blanco del CYP basado en evidencias in vivo por fenotipado de individuos o por estudios de inhibición; NO: Evidencias negativas; SI/NO: Datos contradictorios. (Crescenti, 2007). Elaboración propia.**

Estos hallazgos han promovido numerosos estudios poblacionales, especialmente en orientales y caucásicos. Se han encontrado diferencias inter-étnicas que se adjudican a una distribución al azar de los alelos de este gen.

### **I.5.3.2 Los Polimorfismos en un solo Nucleótido (SNP) del Citocromo P450.**

Los citocromos son hemoproteínas localizadas en la membrana de las mitocondrias y del retículo endoplasmático que intervienen fundamentalmente en la transferencia de electrones en las reacciones de óxido reducción que son reversibles.

Muchas enzimas individuales presentan variaciones en su secuencia génica, llamadas polimorfismos, que pueden o no modificar su secuencia de aminoácidos. Estos polimorfismos se identifican con un asterisco seguido de un número o letra, o ambos (por ejemplo *CYP2D6\*2*), siempre en cursiva. En general, para que un cambio en la secuencia génica de una proteína pueda considerarse un polimorfismo genético y no una simple mutación al azar, el cambio en el gen debe encontrarse en la población general con una frecuencia igual o mayor al 1%. Para cada isoenzima del CYP existen varios polimorfismos genéticos y aunque no todos son relevantes a nivel fenotípico existen algunos de ellos que son determinantes en el metabolismo de fármacos y contaminantes ambientales y de ahí la importancia de su estudio (Gordillo, 2008).

La expresión hepática del complejo enzimático P450 varía extraordinariamente entre diferentes individuos como consecuencia de factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales (Clarke, 1998). Algunos P450 presentan expresión polimórfica lo que conduce a variantes de la enzima generando una alteración en la actividad catalítica de la misma (<http://www.imm.ki.se/CYalleles>). La frecuencia de aparición de polimorfismos de la enzima varía notablemente entre diferentes grupos étnicos (Ma et-al., 2002).

Los diferentes fenotipos pueden traducirse en variaciones significativas del metabolismo de algunos fármacos en determinados individuos y como consecuencia de ello, pueden observarse alteraciones de sus parámetros

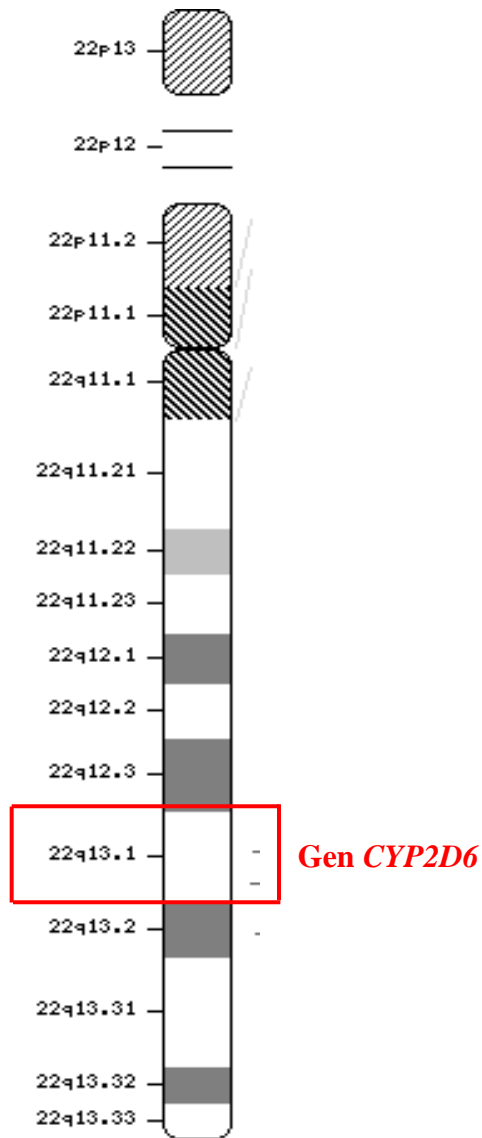
farmacocinéticos, disminución de su eficacia terapéutica o un mayor riesgo de efectos adversos.

#### **I.5.4 Polimorfismos del Gen *CYP2D6***

Dentro de la subfamilia *CYP2D*, en el hombre sólo se ha identificado el *CYP2D6*, el cual se expresa en hígado y no es inducible. Se trata posiblemente del P450 más popular entre los médicos y profesionales de la salud debido a su polimorfismo genético (Gordillo, 2008). De todas las isoformas del citocromo P450, el *CYP2D6* es sin duda el que posee la mayor influencia genética dado que los factores ambientales influyen muy poco en su expresión y actividad (Zanger et-al., 2008).

Esta isoforma está implicada en el metabolismo de muchos fármacos, entre ellos,  $\beta$ - bloqueadores, antidepresivos tricíclicos, neurolépticos y antiarrítmicos y su gen presenta más de 90 variantes, las cuales están descritas en la siguiente página Web: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm> muchas de las cuales generan productos con baja expresión o disminución en la actividad de la enzima.

**Figura I.2:** Localización del gen *CYP2D6* en el cromosoma 22.



Se han establecido tres fenotipos de la enzima que se conocen como metabolizadores lentos (con alelos defectivos), metabolizadores rápidos (forma nativa o variantes alélicas sin consecuencias funcionales) y metabolizadores ultrarrápidos (con múltiples copias del gen). El impacto clínico de estas alteraciones en la actividad del *CYP2D6* se hace patente al observar la larga

lista de agentes terapéuticos que son sustratos de la enzima (Bertilsson, et-al., 2002 & Scordo et-al., 2002).

El polimorfismo genético del *CYP2D6* se ha relacionado también con diferente susceptibilidad a la enfermedad de Parkinson y al cáncer de hígado o de pulmón (Silvestri et-al., 2003 & Foltynie et-al., 2002). Es de destacar el hecho de que el *CYP2D6* es considerada la segunda enzima más importante en el metabolismo de fármacos (después del *CYP3A4*), ya que se estima que más del 25% de los fármacos son sustratos de la misma, cifra superior a la de otras enzimas más abundantes como *CYP1A2*, *CYP2C9* o *CYP2E1* (Ver Tabla 01) (Smith et-al., 1998). Este dato contrasta con el contenido relativamente bajo de la enzima en hígado, ya que representa en torno al 2-5% del Citocromo P450 total. (Smith, Ackland & Jones, 1997).

El descubrimiento de los polimorfismos de *CYP2D6* tuvo lugar cuando un individuo, al tomar una dosis de prueba de debrisoquina (un fármaco bloqueador adrenérgico usado para el tratamiento de la hipertensión), sufrió un colapso con hipotensión vascular. Los estudios en este individuo demostraron que los efectos observados se debían a una metabolización lenta de la debrisoquina causada por un polimorfismo en el gen *CYP2D6* que producía una enzima defectuosa en la hidroxilación. Se ha demostrado una amplia variación individual en la respuesta hipotensora a este fármaco, así como una mayor sensibilidad a los efectos antihipertensivos de la debrisoquina como consecuencia del metabolismo lento. Para evaluar el tipo de metabolismo se utilizó la relación de debrisoquina y 4-hidroxidebrisoquina presente en la orina después de la ingesta de una dosis oral única de 10mg del fármaco. Dicha relación en la población estudiada se distribuyó como dos campanas superpuestas y aproximadamente el 3 por ciento de los individuos resultaron no metabolizadores. Estudios posteriores demostraron que los metabolizadores



lentos (PM) tienen cantidades disminuidas del Citocromo P450 tipo 2D6 (Ostrosky, 2006).

Por otro lado el *CYP2D6* tiene un amplio rango de actividad en la población humana, con índices de variación en el metabolismo entre individuos que pueden diferir hasta 10 mil veces. Esta variación permite vislumbrar la dificultad que conlleva el predecir la dosis, seguridad y eficacia de cada uno de los fármacos metabolizados por *CYP2D6*.

De igual forma se han identificado y asociado varios SNPs del *CYP2D6* con alteraciones del metabolismo de debrisoquina y drogas estructuralmente relacionadas. Estos cambios genómicos son los responsables del amplio rango de acciones llevadas a cabo por la enzima *CYP2D6*: desde un metabolismo ultra-rápido hasta ausencia absoluta de acción.

Los portadores homocigotes o heterocigotes de deficiencias en el alelo *CYP2D6* metabolizan las drogas en baja proporción (MP: Pobres Metabolizadores ó ML: Metabolizadores Lentos) permitiendo una permanencia más prolongada en circulación, con mayor riesgo de efectos tóxicos. En cambio, los individuos que presentan duplicación del gen activo *CYP2D6* o poseen el alelo *CYP2D6\*2* metabolizan las drogas en forma ultra-rápida (UM: Metabolizadores Ultrarápidos) (Spavieri & Rotenberg, 2004).

En la **Tabla I.3** se detallan los fármacos más importantes metabolizados por la enzima *CYP2D6*.

<b>Anti Hipertensivos</b>			
<b>Alprenolol</b>	Bufuralol	Bunitrolol	Bupranolol
<b>Carteolol</b>	Clonidine	Debrisiquina	Guanoxan
<b>Indoramina</b>	Losartan	Metoprolol	Nimodipine
<b>Nitrendipina</b>	Oxiprenolol	Propranolol	Timolol
<b>Anti Arrítmicos.</b>			
<b>Amiodarona</b>	Aprindina	Encainida	Flecainida
<b>Mexiletina</b>	Procainamide	N-propilajmaline	Propafenona.
<b>Esparteína</b>			
<b>Antidepresivos</b>			
<b>Amiflavina</b>	Amitriptiline	Brofaromina	Citalopram
<b>Clomipramina</b>	Desmetrilcitalopram	Disipramina	Fluvoxamina
<b>Fluoxetina</b>	Imipramina	Maprotilina	Minaprina
<b>Muclobemida</b>	Nefazodone	Nortriptilina	Paroxetina
<b>Tomoxetina</b>	Tranilcipromina	Trimipramina	Venlafaxina
<b>Neurolépticos</b>			
<b>Clozapine</b>	Haloperidol	Levomepromazina	Olanzapina
<b>Perfanazina</b>	Pimozide	Risperidona	Sertindole
<b>Tioridazina</b>	Zuclopentixol		
<b>Narcóticos.</b>			
<b>Codeína</b>	Dihidrocodeína.	Dextrometorfano	Etilmorfina

<b>Hidrocodona</b>	Norcodeína	Oxicodona	Tramadol
<b>Agentes Quimoterapéuticos.</b>			
<b>Clotrimazole</b>	Doxorubicina	Ketoconazola	Mefloquine
<b>Pirimetamina</b>	Rifampicina	Ritonavir	Roxitromicina
<b>Sulfasalazina</b>			
<b>Antihistamínicos</b>			
<b>Azelastine</b>	Cinnarizina	Loratadina	Prometazina

Fuente: (Benny & Adithan, 2001); Redacción propia.

Aunque en el hígado encontramos una pequeña cantidad de la enzima *CYP2D6*, ésta metaboliza un cuarto de todas las drogas prescritas. Esto puede ser porque muchos de las drogas metabolizadas por *CYP2D6* son blancos del sistema nervioso central (Benny & Adithan, 2001). Los polimorfismos del gen *CYP2D6* son clínicamente más significativos para antidepresivos tricíclicos, ciertos neurolépticos, antiarrítmicos, antidepresivos y derivados de morfina. Para antidepresivos tricíclicos, ambos fenotipos los ML y MU del *CYP2D6* tienen riesgo de reacciones adversas. Para individuos ML que reciben dosis estándar de drogas, estos pueden presentar concentraciones tóxicas en el plasma del individuo, resultando en efectos secundarios desagradables incluyendo boca seca, hipertensión, sedación y temblor o cardiotoxicidad en algunos casos con peligro potencial de muerte (Benny & Adithan, 2001). Así el impacto clínico del *CYP2D6* depende de las necesidades metabólicas, que deben ser cuidadosamente investigadas para cada sustrato, probados tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

#### **I.5.4.1 El Gen *CYP2D6* y Clases de Metabolizadores**

El gen *CYP2D6* es altamente polimórfico de modo que se han encontrado cerca de 90 variantes alélicas. Esta variación genética ha sido correlacionada con tres clases de fenotipos basados en la capacidad de metabolizar las drogas:

- Metabolizador Ultrarápido (UM): la presencia de este fenotipo es causado por la duplicación, multiplicación o amplificación de genes activos *CYP2D6*, incluyendo principalmente el alelo *CYP2D6\*2* y el alelo *CYP2D6\*1*; además el metabolismo ultrarápido puede estar relacionado con los alelos *CYP2D6\*35*. Los individuos que presenten el fenotipo UM metabolizan las drogas a un ritmo ultrarápido lo que puede provocar disminución en la eficacia del tratamiento con dosis estándar.
- Metabolizador Intermedio (IM): este fenotipo es expresado por la mayoría de la población por los que es considerado como “normal” (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).
- Metabolizador Lento (PM): de este fenotipo origina un metabolismo lento o pobre de la droga o medicamento ingerido produciendo una acumulación del fármaco en el organismo y consecuentemente generando un alto riesgo de efectos adversos en el individuo. Los alelos responsables de un metabolismo lento son *CYP2D6\*3*, *\*4*, *\*5* y *\*6*. Además han sido identificadas las variantes alélicas que resultan en una alteración o disminución del metabolismo de drogas es así que Kagimoto et-al., (1999) identificó la variante alélica *CYP2D6\*10* muy común en población asiática y el alelo *CYP2D6\*17* y *CYP2D6\*41*. con alta incidencia en población negra.

#### **I.5.4.2 Frecuencias de Variantes alélicas del Gen *CYP2D6*.**

Los alelos funcionales incluyen el *CYP2D6*\*1 (tipo nativo) y *CYP2D6*\*2 que tiene aproximadamente un 80% del funcionamiento del tipo nativo y que se encuentra con una frecuencia del 28,5% en población caucásica, este alelo puede afectar severamente el fenotipo metabólico cuando se encuentra en combinación con un alelo nulo (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).

El fenotipo PM en blancos es el resultado de la presencia de alelos defectuosos. Hasta el momento han sido identificados los alelos denominados *CYP2D6*\*3, \*4, \*5 y \*6 que están asociados con fenotipos de metabolizadores lentos e inicialmente han sido encontrados en población caucásica. El fenotipo PM más común en esta población está dado por el *CYP2D6*\*4 con una frecuencia de aproximadamente 22% (Van der Weide & Hinrichs, 2006). Sin embargo estos alelos son raros de encontrar en población asiática y africana, por lo que se explica la baja frecuencia de PM en la misma (Bradford, 2002).

También han sido identificadas las variantes alélicas que resultan en una alteración o disminución del metabolismo de drogas. Kagimoto et-al. (1999) identificaron la variante alélica *CYP2D6*\*10 dando como resultado una reducida o inestable actividad de la enzima. El alelo *CYP2D6*\*10 tiene una frecuencia del 50.7% en población china y 38.1% en población japonesa, una tasa relativamente alta en comparación con el 1.5% encontrado en población caucásica (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).

En población africana la base de la disminución de la actividad en la enzima *CYP2D6* es la presencia de la variante alélica *CYP2D6\*17*, identificada originalmente en población Zimbabue con una frecuencia del 34% (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005). Diversos estudios sugieren que esta mutación alélica es similar a *CYP2D6\*10* presente en muchos asiáticos y es asociado con un metabolismo lento (PM) y está presente con mucha frecuencia en población negra.

La base genética del fenotipo (UM), está dada por una multiplicación o duplicación de los alelos funcionales del gen *CYP2D6*, principalmente el *CYP2D6 \*1* y *\*2*, dando como resultado altos niveles de enzima en el organismo; es así que en caucásicos suizos se ha reportado un porcentaje de 1-2% de sujetos con multiplicación/duplicación de genes (*CYP2D6\**X*N*), 3.6% en alemanes, 7-8% en españoles y 10% en sicilianos. En contraste, en población negra etíopiana se ha reportado un porcentaje relativamente alto de alelos *CYP2D6* duplicados, 29% seguida por población egipcia y árabe con un 20% (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005).

Recientemente Raimundo et al identificaron la mutación *CYP2D6\*41* que está asociada con una función bimodal del alelo *CYP2D6\*2*, el mismo que es muy frecuente en estudios de polimorfismos (Raimundo et-al., 2004).

**Tabla I.4:** Frecuencias alélicas *CYP2D6* en diferentes grupos poblacionales.

Poblaciones Blancas Europeas	Nº	No funcional	Disminuida	Multiplicación
------------------------------	----	--------------	------------	----------------

		*3	*4	*5	*6	*10	*17	*1 o *2x*2	*4x2
Alemanes	195	.01	.195	.041	.013	.02	0	.016	0
Alemanes	308					.018	----	.012	
Alemanes	589	.02	.207	.02	.009	.015	----	.02	.001
Croatas	200	.028	.14	.01	.015	----	----	.02	----
Españoles	258	.012	.116	.019	.016	----	----	.033	0
Españoles	147	.01	.201	.041	----	----	----	.059	
Españoles	142	0	.169	.014	.067	.021	0	.039	.007
Españoles	105	.009	.138	.033	.009	.019	----	.042	----
Franceses	672	.018	.189	.073	.014	.014	.001	----	----
Holandeses	765	.018	.184	----	.004	----	----	----	----
Italianos	360	.007	.153	.034	.014	----	----	.042	----
Polacos	300	.013	.023	----	----	----	----	----	----
Rusos	290	.01	.182	.024	.012	.042	----	.022	0
<b>Norteamericanas</b>									
Blancos	464	.012	.181	.029	.007	.04	0	----	----
Blancos	208	.01	.175	.038	.01	.019	.002	.009	.002
Blancos	143	.014	.199	.021	----	.008	.003	.014	
Blancos	206	.01	.209	.027	.009	.007	0	.02	0
Afroamericanos	127	.002	.085	.06	----	----	----	----	----
Afroamericanos	246	.006	.73	.069	----	.04	.26	.024	----
Afroamericanos	154	.003	.78	.062	----	.075	.146	.014	----
Afroamericanos	502	.002	.054	.066	.004	.036	.213	.038	.003
<b>Asiáticas</b>									
Compilación <sup>a</sup>	179	.001	0	.057	----	.5	----	.01	----
Chinos	119	----	0	.046	----	.647	----	----	----
Japoneses	206	0	.002	.045	----	.381	0	.01	----
Japoneses	98	0	.005	.061	----	.408	0	0	0
Japoneses	162	0	0	.062	----	.386	0	----	----
Malayos	107		.028	.051		.495	.005	.009	
Indios	106	0	.066	.009	----	.203	----	----	----
<b>Africanas</b>									
Ganeses	193	.003	.07	.006	0	.031	.277	.016	----
Gaboneses	154	0	0	.007	----	0	.24	----	----
Zimbawenses	80	0	.025	.038	----	.056	.34	.025	----
Etíopes	122	0	.012	.033	----	.086	.09	.16	----

Vendas	76	0	.033	.046	----	----	.24	----	----
Tanzanos	106	.005	.014	.033	----	----	.203	----	----
Tanzanos	106	0	.009	.061	0	.038	.17	.033	.009
<b>Otras</b>									
Turcos	404	0	.113	.014	.007	.06	.011	.055	.002
Árabes saudíes	101	0	.035	.01	0	.03	.03	.104	----
Israelíes	161	.01	.094	.024	----	.076	.043	.05	----

Nº: número de individuos; \*: Johansson, 1996 & Llerena, 2001.

Redacción propia.

Algunos estudios hechos en población amerindia e hispana, demuestran una frecuencia moderada del alelo *CYP2D6\*4*, pero más alta en comparación con la población asiática. Cabe recalcar que la presencia del alelo *CYP2D6\*4* en población amerindia es más baja que en población hispana, ya que para esta última la frecuencia del alelo es más similar al de la población europea, incluyendo los datos de población española.

Además, la mayor frecuencia de alelos con función incrementada se observa en población mexicana y española y la presencia de otras variantes genéticas en población hispana también han sido estudiadas. Sus frecuencias son similares a las observadas en población europea. A continuación se detalla una tabla de frecuencias alélicas reportadas en diferentes estudios de población hispana.

**Tabla I.5:** Frecuencias de los alelos *CYP2D6* en diferentes poblaciones hispanas.

País	Grupo	Nº	No funcional					Disminuida		Incrementada
			*3	*4	*4x2	*5	*6	*10	*17	*1 o *2x*2
Chile <sup>1</sup>	Mapuche	84	0	.036	Ne	.042	0	.018	0	0



Colombia <sup>2</sup>	Mestizo	121	.012	.194	.004	.008	0	ne	.016	.008
Col.-Panamá <sup>3</sup>	Ngawbe	105	0	.171	Ne	0	.005	.175	ne	ne
Col.-Panamá <sup>3</sup>	Embera	136	0	.140	Ne	0	.011	.069	ne	ne
México <sup>4</sup>	Mestizo	243	.014	.112	Ne	.027	ne	.125	.017	.128
México <sup>5</sup>	Mestizo	264	.002	.1	Ne	.017	.004	.028	.002	.008
México <sup>6</sup>	Tepehuano	85	0	.006	Ne	ne	0	0	ne	ne
México <sup>6</sup>	Mestizo	110	.009	.131	Ne	ne	0	.023	ne	ne
México-USA <sup>7</sup>	Mestizo	349	.003	.103	Ne	.023	ne	.074	.007	.01
Nicaragua <sup>8</sup>	Mestizo	137	.018	.157	Ne	.036	ne	.033	ne	.011
España <sup>9</sup>	Blanco	142	0	.169	.007	.014	.067	.021	0	.039

ne: No estudiados

Fuente: 1. Muñoz et-al., 1998; 2. Isaza et-al., 2000; 3. Jorge et-al., 1999; 4. López et-al. 5. Luo et-al., 2005; 6. Sosa Macías et-al., 2006; 7. Mendoza et-al., 2001; 8. Agúndez et-al., 1997; 9. Llerena et-al., 2006. Elaboración propia.

#### I.5.4.3 Variabilidad poblacional de *CYP2D6*

La distribución del fenotipo de *CYP2D6* es variada de acuerdo a la población de cada continente. En general en población europea blanca el porcentaje de metabolizadores lentos LM (PM: Metabolizadores Pobres) varía entre el 3.2% en Finlandia al 11.7% en Alemania; así como en Inglaterra y Suiza se han reportado incidencias altas de 8.9% y 10% respectivamente (Bernard et-al., 2006). En el área mediterránea, el porcentaje de PM varía entre el 7.9% en italianos al 4.7% en españoles y 3% en Turquía (Llerena, et-al., 2009).

Por el contrario, la prevalencia de PM en poblaciones de Asia es relativamente baja, particularmente en población tailandesa, china y japonesa el porcentaje varía entre un 0% a 1.2%. La prevalencia del fenotipo PM es

ligeramente superior en población al suroeste de Asia, con frecuencias de 1.8% - 4.8% (Bernard et-al., 2006).

En el continente africano, la prevalencia de PM tiene un rango de variación amplio ya que va desde 1.8% de PM en Etiopía y 2 % - 3 % de PM en Zimbabue y Gana, en Tanzania y Nigeria está entre el 7 % - 8 % (Llerena, et-al., 2009). Cabe recalcar que Bernard et-al., 2006 reportan un porcentaje de variación mucho más alto entre el 0% al 19% en poblaciones africanas, además que reporta estudios de PM en población afroamericana con una variación del 1.9% al 7.3%. De la misma forma dos grupos étnicos estudiados en Oceanía muestran un 5 % de PM en Maories y 0% de PM en el Sur de Polinesia.

En población hispanoamericana, los fenotipos metabolizadores de debrisoquina, han sido determinados en cubanos, nicaragüenses y amerindios de Panamá, reportándose una frecuencia de PM del 4.6%, 5.6% y 0% respectivamente. En conclusión se puede decir que a partir de los pocos estudios realizados en población hispana, la prevalencia del fenotipo PM de *CYP2D6* está entre un 2.2% - 6.6% (Bernard et-al., 2006).

**Tabla I.6:** Capacidad de hidroxilación de *CYP2D6* evaluada con debrisoquina, dextrometorfano, esparteína en diferentes estudios en población hispana.

Cuidad	Grupo Étnico	Nº	% ML
Cuba	Caucásico – Cubano	131	5,3 (dbq)
Cuba	Mexicano – Cubano	129	3,9 (dbq)
España	Caucásico – Europeo	925	4,9 (dbq)

<b>Nicaragua</b>	Mestizos - Nicaragüenses	125	5,6 (dbq)
<b>Panamá</b>	Cuna	89	0 (dbq)
<b>USA</b>	Americano – Mexicano	285	3,2 (dxt)
<b>USA</b>	Americano – Mexicano	236	10 (dxt)
<b>USA</b>	Americano – Mexicano	50	6 (dxt)
<b>México</b>	Mestizo – Mexicano	100	10 (dxt)
<b>México</b>	Mestizo – Mexicano	88	6,8 (dxt)
<b>Panamá</b>	Cuna	170	0 (spt)
<b>Panamá, Colombia</b>	Ngawbe	344	4,4 (spt)
<b>Panamá Colombia</b>	Embera	153	2,2 (spt)
<b>México</b>	Tepehuano	58	0 (dxt)
<b>España</b>	Cucásico – Europeo	149	10 (dxt)

(dbq): Debrisoquina; (dxt): Dextrometorfan; (spt): Esparteína; ML: Metabolizadores Lentos.

Fuente: (Llerena, Dorado, & Peñas Lledó, 2009). Elaboración propia.

De igual forma las consecuencias clínicas de un metabolismo ultrarápido UM, pueden ser igual de trascendentales que aquellos con el fenotipo PM en tratamientos terapéuticos; sin embargo todavía no existen estudios muy amplios con respecto a esto. Los estudios disponibles, sugieren que la frecuencia de UM varía entre los grupos étnicos, con estudios que reportan baja prevalencia en algunos países europeos (0,8% en Dinamarca y Alemania, 1,0% en Suecia) (Bathum et-al., 1998) y una prevalencia mucho mayor en las poblaciones de los países del mediterráneo (8,7% en Turquía y 10% en España) (Bernal et-al., 1999).

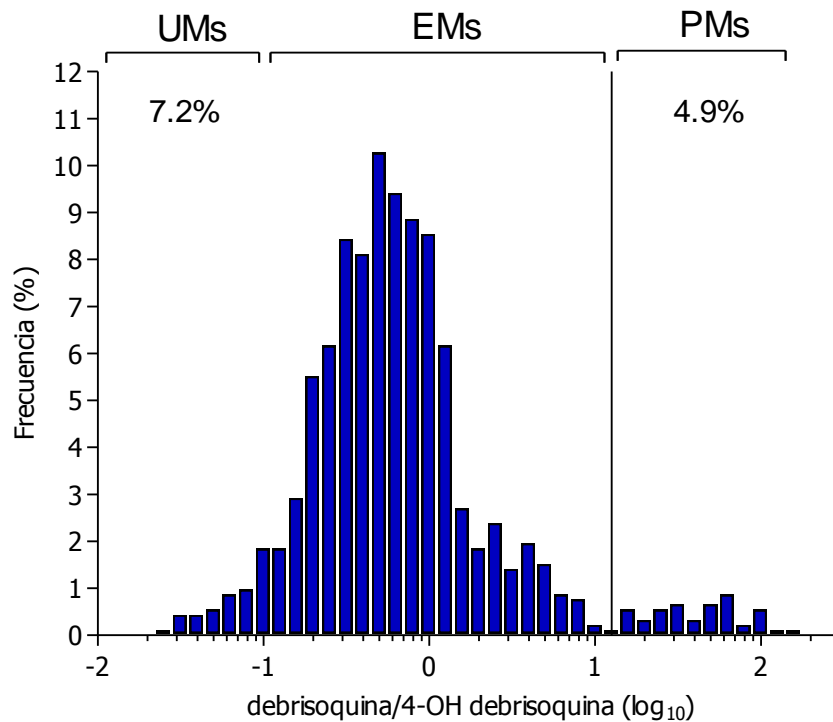
Las frecuencias más altas del fenotipo se reportan en los etíopes (29%) (Aklillu et-al., 1996) y Arabia Saudí (21%) (McLellan et-al., 1997). Las tasas de prevalencia del fenotipo UM en caucásicos y afroamericanos son del 4,3% y 4,9%, respectivamente (London et-al., 1997).

La incidencia del fenotipo PM parece ser mayor entre los caucásicos, posiblemente como resultado de efectos externos como hábito de fumar o ingerir alcohol en la población. Este fenotipo es menos frecuente en poblaciones africanas y asiáticas. Por el contrario, el fenotipo de la UM es más común en África oriental y parece haber trazado una ruta migratoria en las poblaciones españolas. Este fenotipo es relativamente poco frecuente en los caucásicos y entre los africanos occidentales y asiáticos (Bernard et-al., 2006). Esta variación de frecuencias en los fenotipos PM y UM es el resultado de heterogeneidad genética y de las distintas frecuencias de ML en Europa, África y en población amerindia.

#### **I.5.4.4 Relación feno-genotipo metabólico del gen *CYP2D6***

La distribución bimodal de los fenotipos metabólicos de la debrisoquina sugiere una posible herencia monogénica del carácter. Sin embargo, teóricamente la distribución de los fenotipos de un carácter monogénico recesivo debería ser trimodal (correspondiente a los genotipos *CYP2D6* homocigoto recesivo, heterocigoto y homocigoto dominante), hecho que en la práctica no ha podido ser demostrado. La explicación de la existencia de bimodalidad en este caso, es que los heterocigotos y los homocigotos dominantes no pueden ser separados funcionalmente por métodos de fenotipificación, debido a la existencia de solapamiento en la distribución de sus IM (Índice Metabólico).

**Figura I.3:** Tasa metabólica de debrisoquina en 925 voluntarios sanos españoles (Llerena A et-al., 1993) UM: Metabolizadores Ultrarrápidos; EM: Metabolizadores Rápidos o Intermedios; PM: Metabolizadores Lentos.



La relación fenotipo *CYP2D6* presenta ciertas controversias, en parte relacionadas con las diferencias interétnicas en la frecuencia de variantes alélicas y los fenotipo metabólicos. En general, no todas las variantes alélicas del gen *CYP2D6* expresarán enzimas con distinto fenotipo, Diferentes variantes alélicas pueden producir individuos clasificables en el mismo rango de fenotipo metabólico, El hecho de que la actividad enzimática se vea alterada en mayor o menor medida, dependerá del tipo de alteración, genética y del lugar del gen donde ésta se produzca. Existe, por tanto, un solapamiento en la relación fenotipo *CYP2D6* (Dorado, 2003).

Diversos estudios realizados en poblaciones blancas han demostrado que los PM del *CYP2D6* tiene un IM aumentado en sujetos con un solo alelo funcional del *CYP2D6*, comparado con los sujetos que tienen 2 alelos funcionales (Evans et-al., 1991). En Estonia, todos los PM de la debrisoquina tenían 2 alelos defectuosos, también se encontró una alta actividad enzimática de la debrisoquina que estaba dada por una duplicidad de alelos *CYP2D6* (Marandi et-al., 1996).

En un estudio de población alemana, el 86% de los PM tenían variantes \*3, \*4, \*5, \*6 y \*15 (Sachse et-al., 1997), aunque en este estudio se incluyen voluntarios sanos y pacientes con varias patologías. En estas poblaciones se realizó un estudio de fenotipificación con esparteína observándose que todos los fenotipos PM tenían 2 alelos no funcionales (\*4/\*4, \*4/\*5 y \*4/\*6). Además, los llamados UM no se distinguían del grupo, no había una separación basada en la distribución del IM (Griese et-al., 1998).

Marez et-al. (1997) llegan a la conclusión de que los alelos \*3, \*4 y \*6 llevaban una mutación defectuosa, es decir, estaban asociados con una actividad deficiente del *CYP2D6* y, consecuentemente, con un fenotipo lento. Sin embargo, es necesario señalar que en este estudio no sólo se estudiaron voluntarios sanos, sino también pacientes con diversas patologías.

Posteriormente, Leathart et-al. (1998) plantean que el 71.9% de los PM caucásicos tenían variantes \*3, \*4 y \*5 con dos alelos defectuosos y más recientemente, Pedersen et-al., (2005) plantean que el 92.8% de los PM de la esparteína tienen variables \*3, \*4 y \*6. Bernal et-al., (1999) reportaron en su estudio que el 10% de los españoles tienen duplicación y triplicación de genes

del *CYP2D6* y que las variantes \*3, \*4 y \*5 tienen una actividad deficiente del fenotipo de la debrisoquina.

En poblaciones africanas, la variable *CYP2D6\*17* es la más frecuente y responsable de la baja actividad del *CYP2D6* en poblaciones negras (Panserat et-al., 1999), además en este estudio observamos la alta frecuencia de los alelos \*2 y \*17 en el fenotipo metabólico intermedio.

En otro estudio de población negra, (Gríese et-al., 1999) se encontró un sujeto *CYP2D6 wt/wt* con un fenotipo lento de la debrisoquina y la esparteína, lo cual demuestra que aún existe desconocimiento de alelos no funcionales y que la escasa actividad metabólica en negros no puede ser explicada únicamente por la alta frecuencia del alelo \*17, ya que se observa una media alta del IM de la esparteína entre los PM con genotipo *wt/wt*. Cuando se compara la población etíope con las poblaciones caucásica, oriental y otras negras, la etíope es genéticamente diferente con respecto al locus *CYP2D* (Aklillu et-al., 1996). Además, se ha observado que el 18% del aumento del IM es por la variable \*17. En otros estudios, la media del IM de los PM es mayor en población negra que en caucásicos (Masimirembwa et-al., 1996; Wennerholm y et-al., 1999). También se ha observado una disminución de la capacidad metabólica del *CYP2D6*, pues un 59% de los PM en población africana tienen un IM de la debrisoquina mayor que 1 vs 20% en caucásicos (Wennerholm et-al., 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la variante \*17 en africanos disminuye la actividad del *CYP2D6* y es la más común entre los PM, además, en la variante \*2 la media del IM fue más alta en negros americanos que en sujetos blancos, esto es indicativo que deben existir otros factores no identificados y que están contribuyendo a la baja actividad del *CYP2D6* (Gaedigk et-al., 2002). Así se ha planteado que la baja actividad del *CYP2D6*

en afroamericanos está determinada por las variantes \*4, \*5 y \*17 y en caucásicos por la variante \*4 y XN (Wan Yu et-al., 2001).

En relación a estudios de poblaciones hispanas en una población méxico-americana, el 50% de los PM fueron homocigotos *CYP2D6*\*4 y todos los sujetos con 2 alelos inactivos tenían muy disminuida la actividad enzimática, el 63% de los PM tenían variantes inactivas \*4 y \*5, y ninguno de los sujetos clasificados como PM tenía más de un alelo no funcional (Mendoza et-al., 2001). Posteriormente, en otro estudio de población mexicana (López et-al., 2005) se observó una disminución en la media del IM del dextrometorfano (actividad enzimática aumentada) con relación a un mayor número de genes activos *CYP2D6*. También en mexicanos (Luo et-al., 2005) se observó que los alelos inactivos *CYP2D6* \*4, \*5, \*6 y \*10 son los principales responsables de la disminución de la capacidad de oxidación del dextrometorfano.

En poblaciones orientales se ha observado un bajo porcentaje de PM y la distribución del IM en los PM es más alta en poblaciones orientales que en poblaciones blancas europeas (Bertilsson et-al., 1992; Nakamura y et-al., 1985; Dahl et-al., 1995). Una de las posibles causas de la baja incidencia de PM en poblaciones orientales es la ausencia de la variante *CYP2D6*\*4 (Bertilsson et-al., 1992; Johansson et-al., 1994) y la baja actividad del *CYP2D6* es debida a la existencia de una alta frecuencia de las variantes alélicas *CYP2D6*\*10 y *CYP2D6*\*36 (51% y 37%, respectivamente) (Johansson et-al., 1994). Ambas variantes alélicas codifican enzimas inestables, lo que provocaría una disminución en la actividad catalítica que podría explicar los IM tan altos observados entre los PM de poblaciones orientales.



Además, en los estudios de población japonesa se observa que los homocigotos \*10/\*10 muestran un IM más alto que los homocigotos *wt/wt* y que los heterocigotos *wt/\*10*. Aproximadamente el 20% de la población japonesa muestra una baja actividad del *CYP2D6* por individuos homocigotos \*10 (Tateishi et-al., 1999). Kubota et-al. (2000) muestran que los alelos \*5 y \*14 son alelos defectuosos y responsables del 83% de los PM. Sin embargo, a pesar de la baja frecuencia del fenotipo ML en la población japonesa, sólo el alelo \*5 representa el 45% de los PM. Igualmente, en otros estudios, la mutación \*10 es la principal responsable del aumento del IM en PM y continúa siendo la variante más frecuente del genotipo *CYP2D6* en poblaciones orientales.

En el sur de Europa, en población turca hay una disminución en la frecuencia de PM (1,4%) y un correspondiente incremento de UM (8.6%) del *CYP2D6*, las variantes alélicas defectuosas \*3,\*4 \*5 y \*6 tienen una baja frecuencia en turcos (Aynacioglu et-al., 1999). Este trabajo coincide con un estudio en Arabia Saudita, donde se observan muy pocos alelos defectuosos y una mayor frecuencia de genes duplicados, representando estos últimos el 21% de la población estudiada (McLellan et-al., 1997). Más recientemente Luo et-al. (2004) observaron en su estudio diferencias significativas en las frecuencias de variables alélicas del *CYP2D6* entre los grupos étnicos estudiados en Israel.

En varios estudios se plantea que la duplicación y multiplicación del *CYP2D6* dará lugar a un fenotipo UM, sin embargo, en un estudio de población sueca solamente el 40% de la población estudiada con IM de la debrisoquina por debajo de 0.1 (UM) eran portadores de duplicaciones / multiplicaciones del *CYP2D6*, además, el 60% de los UM no fueron identificados por genotipificación (Dahl et-al., 1995).

La alta frecuencia de individuos UM en la población española (Llerena et-al., 1996) ha sido explicada por la alta frecuencia de multiplicaciones del gen *CYP2D6*, sin embargo, la relación causa-efecto del mayor número de copias con un fenotipo UM del *CYP2D6* permanece sin aclarar.

### **I.5.5 Bases Moleculares del gen *CYP2D6***

Eichelbaum et-al. (1987) y González et-al. (1988) en un estudio conjunto secuenciaron el gen que codifica para la debrisoquina hidroxilasa en el cromosoma 22. Independientemente, otro grupo (González et-al., 1988) aisló el ADNc humano del *CYP2D6* y lo comparó con el de rata, observándose una similitud del 71% y 73% en sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Mediante el uso de células somáticas híbridas de humano y roedor, el gen *CYP2D6* fue localizado en el cromosoma humano 22 (locus *CYP2D*). En el hígado de los individuos PM (Metabolizadores Lentos) fueron encontradas algunas variantes de mRNA del *CYP2D6* con diferentes longitudes (González et-al., 1988). Después de clonar y secuenciar el gen *CYP2D6* (Kimura et-al, 1989) fue posible buscar mutaciones en individuos PM mediante el empleo de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Heim y Meyer, 1990; Daly et-al., 1990). Dentro del cromosoma 22, el gen *CYP2D6* está formando parte de un tándem que contiene además los pseudogenes *CYP2D7* y *CYP2D8P* y como el resto de los miembros de la subfamilia CYP2 contiene 9 exones (González, 1991).

El gen *CYP2D6* es altamente polimórfico, con diferentes alelos que causan una actividad normal, ausente, disminuida o aumentada de la enzima *CYP2D6*. Las variantes genéticas pueden dar lugar a proteínas con una baja actividad enzimática (*CYP2D6*\*10, \*17) o a isoenzimas que, debido a una

delección o a un defecto de “splicing” (corte y ensamblaje), carecen totalmente de funcionalidad *CYP2D6*\*3, \*4, \*5 y \*6. Las variantes alélicas de este gen más frecuente en poblaciones caucásicas son las denominadas *CYP2D6*\*1 (“wild type” o silvestre), *CYP2D6*\*2 (actividad normal), *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5, *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*10 y *CYP2D6*\*6 (Gaedigk et-al., 1999) (Ver Tabla I.7).

Aunque actualmente se han identificado muchas variantes alélicas, el análisis de *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5 y *CYP2D6*\*6 y las multiplicaciones de *CYP2D6*\*1, *CYP2D6*\*2 y *CYP2D6*\*4 representan alrededor del 99% de las variantes predichas de PMs o UMs en poblaciones blancas europeas (Bradford LD, 2002).

La variante *CYP2D6*\*4 (21% en caucásicos) presenta una sustitución de base G por A en la posición 1934, en el sitio de *splicing* entre el intrón tres y el exón cuatro, provocando un defecto en el procesamiento del ARN y, subsecuentemente, crea un codón de stop prematuro que da como resultado la síntesis de una proteína inactiva que contiene 181 aminoácidos en vez de los 457 del alelo wt (Kagimoto et-al., 1990). La variante *CYP2D6*\*5 es una delección completa del gen, de modo que solo los pseudogenes *CYP2D7* y *CYP2D8P* se encuentran en el cromosoma (Gaedigk et-al., 1991). *CYP2D6*\*3 consiste en un delección de una base 2549A interrumpe el marco de lectura y provoca la terminación prematura de la proteína (Kagimoto et-al., 1990). Por último, la variante alélica *CYP2D6*\*6 es una delección en el exón 3, en la posición 1707T, que provoca un cambio del marco de lectura, generando un codón de stop después de la delección (Saxena et-al., 1994).

En poblaciones asiáticas se ha observado un bajo número de PMs y un aumento del MR entre EMs (Tabla I). En la población china, Johansson et-al (Johansson et-al., 1994) describieron la existencia de dos mutaciones, *CYP2D6*\*36 y *CYP2D6*\*10 con una frecuencia alélica del 37% y del 51%, respectivamente, que conducen a una inestabilidad de la enzima.

El alelo *CYP2D6*\*10 es particularmente común en la población china y japonesa y está asociado con una disminución de la actividad de *CYP2D6* (Johansson et-al., 1994), se presenta por un cambio de base en la posición 100C/T resultando en una sustitución P34S. De igual forma el alelo *CYP2D6*\*41 también puede describir un metabolismo disminuido de la enzima; este polimorfismo se explica por un cambio de base en la posición del promotor -1584G/A (Müller et-al., 2003). Por otro lado, la presencia del alelo *CYP2D6*\*17 entre la población africana muestra también una actividad algo disminuida del *CYP2D6* (Oscarson et-al., 1997) y está dado por un cambio de base en la posición 1023C/T, dando como resultado un cambio en la cadena aminoacídica de T107I (López et-al., 2005).

Algunos de los sujetos con más de dos genes activos *CYP2D6* tienen una actividad metabólica aumentada, estos son los denominados UMs (Bertilsson et-al., 1993). La duplicación/multiplicación del gen *CYP2D6* es relativamente frecuente y explica aproximadamente el 10%-30% del fenotipo UM. La frecuencia de alelos *CYP2D6* duplicados/multiplicados es alrededor del 1% en suecos (Dahl, et-al, 1995), y ocurre entre el 7%-10% en la población española (Agúndez et-al., 1995; Bernal et-al., 1999). Las variantes alélicas *CYP2D6*\*35 también pueden explicar un fenotipo metabólico UM. El alelo *CYP2D6*\*35 se explica por un cambio en la posición 31G/A en el exón 1 y causa un cambio de aminoácidos (Val<sup>11</sup> → Met) (Müller et-al., 2003).

Sin embargo, la multiplicación alélica no necesariamente implica un metabolismo ultrarrápido ya que la multiplicación puede ser de un alelo activo o no activo (por ejemplo multiplicación del *CYP2D6\*4*), lo cual es una mala interpretación común de los datos. Se ha reportado la relevancia de la capacidad oxidativa del *CYP2D6* de los diferentes genotipos *CYP2D6* en un panel de voluntarios sanos, con ninguno (PMs), uno, dos (EMs), o más de dos (UMs) genes activos.

**Tabla I.7:** Variantes alélicas del gen *CYP2D6* más frecuente en poblaciones.

Designación	Proteína	Cambio	Efecto	Actividad Enzima	Referencias
<i>CYP2D6*1</i>	CYP2D6.1	Ninguna	Ninguno	Normal	Kimura et-al. 1989
<i>CYP2D6*2</i>	CYP2D6.2	Varios	R296C; S486T	Normal	Johansson & cols., 1993
<i>CYP2D6*3</i>	CYP2D6.3	2549A>del	Frame-shift	Deficiente	Kagimoto & cols., 1990
<i>CYP2D6*4</i>	CYP2D6.4	1846G>A	Splicing	Deficiente	Kagimoto & cols., 1990
<i>CYP2D6*5</i>	CYP2D6.5	Delec. gen	CYP2D6 del	Deficiente	Gaedick & cols., 1991
<i>CYP2D6*6</i>	CYP2D6.6	1707T>del		Deficiente	Saxena & cols., 1994
<i>CYP2D6*10</i>	CYP2D6.10	100C>T	P34S	Decrecida	Yokota & cols., 1993
<i>CYP2D6*17</i>	CYP2D6.17	1023C>T	T107I	Decrecida	Masimirembwa & cols., 1996
<i>CYP2D6*35</i>	CYP2D6.35	31G>A	V111M	Normal	Müller & cols., 2003
<i>CYP2D6*41</i>	CYP2D6.41	-1584G/A	R296C	Decrecida	Raimundo et al., 2004
<i>CYP2D6 x N</i>	CYP2D6.	-----	N genes	Incrementada	Dahl & cols., 1995

Fuente: (Van der Weide & Hinrichs, 2006). Elaboración propia.

Esta información genética permite optimizar el tratamiento farmacológico al disminuir potencialmente el número de efectos adversos y mejorar la respuesta terapéutica a través de una dosis individualizada que tome en cuenta el genotipo del *CYP2D6* de cada paciente, con el cual algunos individuos se comportan como: metabolizadores lentos, intermedios o rápidos. El uso de la genotipificación para determinar el estado metabólico de la enzima *CYP2D6*, así como el estado metabólico de otros importantes enzimas polimórficas metabolizadoras de fármacos, será una parte integral del cuidado de cada paciente y de su manejo terapéutico (Alanis et-al., 2007).

La variabilidad en humanos con respecto a la respuesta a drogas es principalmente atribuida a diferencias individuales en el metabolismo de estas, debida a factores ambientales tales como la dieta, edad, estilo de vida y la interferencia de otras drogas, así como polimorfismos en genes que codifican para enzimas metabolizadoras de drogas (López et-al., 2005).

De acuerdo a López et-al. & Alanis et-al., los alelos funcionales incluyen *CYP2D6* \*1 (wild type o tipo nativo) y *CYP2D6*\*2 el alelo más común que codifica para la enzima con una actividad reducida, esta enzima representa aproximadamente el 80% del tipo nativo. Los alelos defectuosos más comunes que traen como consecuencia una ausencia de la enzima *CYP2D6* o una alteración de su actividad enzimática son *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5, *CYP2D6*\*10, *CYP2D6*\*17.

### **I.5.6 Estrategias y Métodos de Genotipificación del Gen *CYP2D6***

Existen varias estrategias y métodos para la genotipificación del *CYP2D6* como Single –strand conformation polymorphism (SSCP) (Broly et-al, 1995; Marez et-al, 1997), PCR (Polymerase Chain reaction) en tiempo real (Hiratsuka et-al, 2000; Molden et-al, 2002), microselección para análisis de DNA (Murphy et-al, 2001; Chou et-al, 2003) y Taq Man Real Time PCR (Polymerase Chain reaction) (Schaeffeler et-al, 2003), pero la estrategia más comúnmente usada para genotipificación del *CYP2D6* es una primera PCR diseñada para amplificar una región específica de este gen (Heim et-al, 1991).

Los pequeños cambios de nucleótidos incluidos los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) e inserciones/deleciones de una o unas pocas bases son detectadas en una segunda PCR - RFPL (Restriction fragment length polymorphism) (Sacase C et-al, 1997; Greise et-al, 1998; Gsedigk et-al, 1999; Lundqvist et-al, 1999; Hersberger et-al, 2000). Mediante el uso de una “extra-long polymerase chain reaction” (XL-PCR) es posible amplificar el gen *CYP2D6* entero, el cual puede ser utilizado como template para múltiples PCR y de esta forma poder detectar diferentes mutaciones simultáneamente.

La genotipificación del *CYP2D6* es un instrumento útil en la medicina clínica. Sin embargo uno de los problemas que afronta su empleo es su costo en términos de trabajo, equipos y reactivos, sobre todo en poblaciones mestizas donde potencialmente están presentes un gran número de alelos.

El método duplicado en este trabajo es capaz de identificar los genotipos *CYP2D6* en un gran número de individuos independientemente del grupo étnico al que pertenezcan por un costo razonable. En este método se realizan una PCR y RFLP juntas que permiten alcanzar el 98% de la especificidad en la interpretación del genotipo PM (Dorado P., 2005). Mediante esta técnica se identifica específicamente las duplicaciones del gen *CYP2D6XN* y el alelo *CYP2D6\*5*.

En el presente proyecto de tesis, para la amplificación de los alelos *CYP2D6\*2*, *\*3*, *\*4*, *\*6*, *\*10*, *\*35* y *\*45*, se usó la técnica de Real Time – PCR, que consiste en los procesos de amplificación y detección que se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

### **1.5.7 Análisis estadísticos de polimorfismos genéticos**

Cuando el objetivo de un estudio es identificar un polimorfismo o variante en un gen que está relacionado con una enfermedad se pueden emplear diferentes estrategias. En primer lugar, es importante obtener evidencia de que al menos una fracción de la enfermedad está determinada genéticamente. Para ello son útiles los estudios de agregación familiar, los de gemelos o los de emigrantes. En segundo lugar, hay que identificar dónde están los genes de interés para la enfermedad. En esta fase se realizan estudios



denominados de ligamiento (linkage), que emplean como marcadores genéticos una serie de polimorfismos repartidos por todo el genoma.

En estos estudios se suelen emplear familias grandes con varios miembros afectados y sus análisis permiten identificar zonas del genoma de interés, pero tienen poca resolución. En esas zonas identificadas puede haber centenares de genes interesantes y miles de polimorfismos candidatos. Para identificar con mayor precisión los genes de interés y, dentro de esos genes, el o los polimorfismos responsables, se emplean estudios de asociación, en los que se compara la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado.

Estos estudios suelen seleccionar «genes candidatos» (aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés) y dentro de esos genes se busca como marcadores genéticos a determinados polimorfismos, normalmente de tipo SNP, repartidos a lo largo del gen.

En cuanto a la metodología de estudio, se suelen emplear diseños clásicos basados en individuos no relacionados, como estudios de casos y controles o de cohortes. También se pueden emplear diseños basados en familias, en los que los individuos de control son parientes de los casos, como los diseños de casos y hermanos sanos o tríos (caso y padres) (Iniasta et-al., 2005).

A continuación se detalla la estrategia habitual de análisis de estudios basados en diseños con individuos no relacionados que incluyen información de polimorfismos. Para simplificar, en los ejemplos trataremos el caso de polimorfismos tipo SNP con una única variante, pero los métodos sirven para marcadores más complejos.

### **I.5.7.1 Análisis descriptivo de un polimorfismo**

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variante se le denomina alelo. Si se trata de un SNP, normalmente serán 2 los posibles alelos en un locus: por ejemplo, el cambio de T por C (T > C). Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico (del 1 al 22), cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo y, para el locus T > C del ejemplo, las 3 posibilidades de parejas de alelos son: TT, TC y CC.

Los individuos con los 2 alelos idénticos, sean TT o CC, se denominan homocigotos y los que tienen diferentes alelos (TC), heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

La descripción estadística de un polimorfismo consiste, en primer lugar, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que en nomenclatura genética se denomina estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. En general, las técnicas de laboratorio permiten determinar el genotipo de cada individuo. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estiman directamente calculando la proporción de individuos con

cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo. Por ejemplo, si en una muestra de 200 individuos observamos los siguientes genotipos:

110 TT, 75 TC y 15 CC,

Las frecuencias genotípicas serán:

0,55 TT, 0,38 TC y 0,07 CC,

Las frecuencias alélicas serán:

0,74 T y 0,26 C [ $0,74 = (110 (2 + 75))/(200 (2))$ ]

### **I.5.7.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas

mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. En nuestro ejemplo, si llamamos  $p$  a la frecuencia de T, el primer alelo, y  $q$  a la frecuencia de C, el segundo (suponiendo que sólo hay 2 alelos posibles), las frecuencias esperadas de cada genotipo son:

$$Np^2 \text{ TT}, 2Npq \text{ TC y } Nq^2 \text{ CC},$$

Donde  $N$  es el tamaño de muestra. Si en el ejemplo sustituimos  $p$  y  $q$  por los valores estimados: 0,74 y 0,26 respectivamente, las frecuencias esperadas serán:

$$109,52 \text{ TT}, 76,96 \text{ TC y } 13,52 \text{ CC}.$$

Estas frecuencias esperadas se pueden comparar con las observadas utilizando el test de la  $\chi^2$  HW =  $\sum (O-E)^2/E$ , con 1 grado de libertad. Para el ejemplo HW vale 0,20, que corresponde a una  $p$  de 0,64, por lo que es compatible con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (p. ej., por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (p. ej., por estar asociado con la longevidad). Tampoco

debe olvidarse que si empleamos un nivel de significación del 5%, por azar puede observarse falta de ajuste al esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta en la población del estudio. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad.

### **I.5.7.3 Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad**

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de la  $\chi^2$ . También se pueden calcular las *odds ratios* (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación.

Si es necesario ajustar los análisis por posibles variables de confusión, entonces es preferible emplear modelos de regresión logística por su versatilidad. Además, estos modelos permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores. Llamaremos ahora  $p$  a la probabilidad de ser caso,  $G$  al polimorfismo (que codificará los diferentes genotipos: TT, TC, CC) y  $Z$  a una o más variables por las que se desea ajustar el modelo. El modelo logístico se define por la ecuación:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

Donde  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son parámetros estimados.

Supongamos que el polimorfismo G es un SNP en el que el alelo variante C modifica el riesgo de la enfermedad de interés. Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de C, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos (Tabla 1.8). Los 4 modelos principales de herencia posibles, son:

**Modelo dominante:** Supone que una única copia de C es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos CC tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos TT:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta D_o + \gamma Z$$

**Modelo recesivo:** Supone que son necesarias 2 copias de C para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos TC y homocigotos del alelo más frecuente TT tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante CC:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta R_e + \gamma Z$$

**Modelo aditivo:** Supone que cada copia de C modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos TC y peso 2 a los homocigotos CC:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_{Ad} + \gamma Z$$

**Modelo codominante:** Es el más general, cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad).

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1 He + \beta_2 Va + \gamma Z$$

**Tabla I.8:** Codificación de variables indicadoras para evaluar diferentes modelos de herencia.

Codificación de variables indicadoras para evaluar diferentes modelos de herencia					
	Codominante		Dominante	Recesivo	Aditivo
Genotipo <sup>a</sup>	He	Va	Do	Re	Ad
TT	0	0	0	0	0
TC	1	0	1	0	1
CC	0	1	1	1	2

<sup>a</sup> Genotipos posibles para un polimorfismo en un *locus* bialélico T>C  
Fuente: Iniasta, 2005.

### I.5.8 Importancia Clínica del Estudio de Polimorfismos del Gen *CYP2D6*.

La importancia clínica que tiene el estudio de los diferentes alelos del gen *CYP2D6*, tiene relación con la prevención de varios desórdenes, como por ejemplo, es conocido que el fenotipo de PM (metabolizador lento) del *CYP2D6* está asociado con la enfermedad de Parkinson. Por otro lado es importante conocer que este fenotipo puede proteger contra el cáncer de vejiga y posiblemente también contra el desarrollo de carcinoma de pulmón (McCann, Pond, James, & Le Couteur, 1997).

Además, esta investigación es un estudio innovador, por cuanto en el país no existe información de estudios previos y brinda un beneficio directo al área de la farmacogenética. Es importante crear una base de datos sobre polimorfismos en población sana ecuatoriana para de esta forma encaminarnos hacia la era de la medicina personalizada.

Es ampliamente conocido que factores clínicos y demográficos tales como el género, edad, interacción con otras drogas y dieta afectan la dosis de medicamento que debe ser administrada a los pacientes. Sin embargo, existen casos en los que un individuo no responde como se esperaría a partir de la dosis prescrita, basada en los factores previamente citados. Esta variación en la respuesta interpersonal es causada por variaciones genéticas entre personas. Estudios en este campo han determinado que un 95% de la variación en la respuesta a una droga se deben a diferencias genéticas, manifestada en polimorfismos genéticos (Lanfear & McLeod, 2007).

Con la existencia de suficientes datos científicos que demuestran que las variaciones genéticas heredadas en el gen *CYP2D6* desempeñan un papel



importante en el metabolismo de muchos fármacos ampliamente prescritos, el conocimiento detallado de estas variaciones puede utilizarse para ayudar a individualizar el tratamiento farmacológico mediante la selección de los fármacos más adecuados y el ajuste de la dosis orientada a cada individuo. Estas medidas deben mejorar la respuesta del paciente, puesto que reducen las reacciones adversas y mejoran la eficacia del fármaco (Roche Diagnostics, 2005).

Debido a que en población ecuatoriana no existen datos de investigaciones realizadas para determinar la prevalencia de polimorfismos se propone estudiar polimorfismos de un solo nucleótido en el gen que codifica para la enzima *CYP2D6* en individuos ecuatorianos y con esto empezar a crear una base de datos sobre tipos de metabolizadores que tenemos en nuestro país.

El conocimiento generado del estudio de polimorfismos genéticos en el gen *CYP2D6* contribuirá a elucidar cómo varía éste entre cohortes de pacientes y en particular, la importancia de estas variaciones en las respuestas a los fármacos, encaminándonos directamente hacia la era de la farmacogenética en el Ecuador.

## **II. METODOLOGÍA**

### **II.1 Población de Estudio**

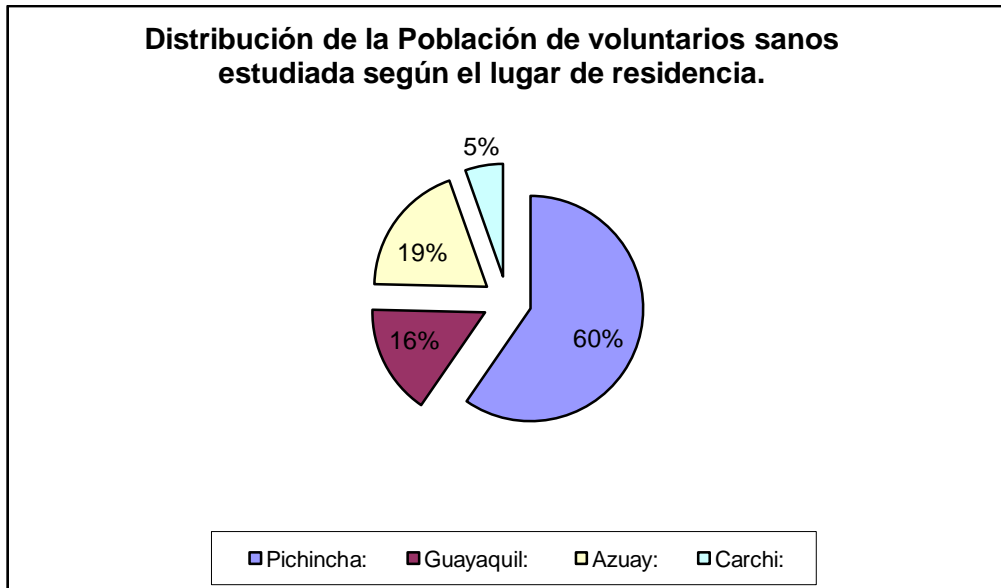
En el presente estudio han participado 207 voluntarios sanos ecuatorianos, de los cuales 119 fueron mujeres y 88 hombres, con una media de edad de  $25.04 \pm 8.47$  años (rango 18-67), el reclutamiento de voluntarios sanos se lo realizó siguiendo los parámetros establecidos por Llerena et-al., 1993a.

A los 207 voluntarios sanos se les analizó el genotipo para las variantes alélicas *CYP2D6*\*1, \*2, \*3, \*4, \*5, \*10, \*35 y \*41, incluido además las duplicaciones del gen *CYP2D6XN*.

Los voluntarios sanos de esta población en su mayoría eran mestizos 95% (n=197), un 4% correspondían a población negra (n=8) y un 1% a población indígena (n=2).

La mayoría de la población estudiada correspondía a estudiantes universitarios de la Facultad de Medicina de la Universidad Central del Ecuador, a la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) y a la Escuela de Medicina de la Universidad Estatal de Guayaquil, siendo los individuos residentes en distintas provincias Ecuador. El 60% de la población era residente en la Provincia del Pichincha (n=121), el 16% era residente en la provincia del Guayas (n=32), un 19% residente en la provincia del Azuay (n=39) y un 5% residentes de la provincia del Carchi (n=11).

**Figura II.1:** Distribución de la población de voluntarios sanos según lugar de residencia.



### II.1.1 Hipótesis

La frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen CYP2D6 en población ecuatoriana es similar a la encontrada en la población hispánica (10%).

### II.2 Cálculo del número de muestras a recolectar

Se propuso un estudio de tipo descriptivo, en el cual se incluirían un total de 150 voluntarios sanos que sean representativos de la población ecuatoriana. A final del estudio se logró reclutar un total de 207 muestras de voluntarios sanos ecuatorianos.

Para la determinación de este grupo de estudio, se utilizó la fórmula del cálculo de tamaño de muestra para la estimación de proporciones poblacionales, tomando en cuenta una precisión del 95% y un poder del 80%:

$$n = \frac{N * p * q * z^2}{(N - 1) * e^2 + p * q * z^2}$$

$$n = \frac{12000000 * 0.10 * 0.90 * 1.96^2}{(12000000 - 1) * 0.05^2 + 0.10 * 0.90 * 1.96^2}$$

$$n = 138$$

Donde:

- N = población ecuatoriana (12000000)
- p = proporción sujetos con polimorfismo *CYP2D6* (10%)
- q = 1 - p
- z = nivel de confianza (1.96)
- e = error máximo (5%)

### II.3 Instituciones

- Centro de Biomedicina (CBM), Universidad Central del Ecuador, Quito – Ecuador.

- Escuela de Medicina, Universidad Central del Ecuador, Quito – Ecuador.
- Escuela Politécnica del Ejército, Quito – Ecuador.
- Escuela de Medicina, Universidad Estatal de Guayaquil, Guayaquil – Ecuador.

## **II.4 Zona de Estudio**

### **II.4.1 Trabajo de Campo**

Las muestras provinieron de diferentes provincias del Ecuador, como son: Pichincha, Guayas, Carchi y Azuay, abarcando así las regiones costa y sierra. El periodo de recolección de muestras se efectuó desde Agosto 2010 hasta Septiembre 2010. La toma de muestra se realizó mediante punción venosa empleando tubos con EDTA correctamente etiquetados.

### **II.4.2 Trabajo de laboratorio**

El almacenamiento de las muestras de sangre y aislamiento de su ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biomedicina, Universidad Central del Ecuador, Sodiro N14-121 e Iquique, Quito, provincia de Pichincha – Ecuador. El proceso de genotipificación de las muestras de ADN se lo realizó en la Universidad de Extremadura y el Hospital Infanta Cristina, en la ciudad de Badajoz, provincia de Extremadura – España.

## **II.5 Protocolo general de investigación**

Este estudio fue aprobado previamente por el Comité de Bioética del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, y antes de la toma de muestra cada uno de los voluntarios leyó y firmo el respectivo consentimiento informado (Anexo 1).

### **II.5.1 Criterios de inclusión:**

A este estudio ingresaron las personas que aceptaron participar en esta tesis previa firma del consentimiento informado, que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- a. Ser mayor de 18 años.
- b. No presentar alergias o alguna enfermedad grave.
- c. No haber ingerido ningún fármaco en las dos últimas semanas antes del estudio.
- d. Ser de nacionalidad ecuatoriana.

### **II.5.2 Criterios de exclusión:**

Que no deseen participar en el estudio o que no cumplan con los criterios de inclusión.

### **II.5.3 Genotipificación del Gen *CYP2D6*:**

Para la determinación del genotipo *CYP2D6* se recogieron 6ml de sangre venosa periférica en tubos con EDTA potásico (Vacutainer®, BD, EE.UU). El tubo se etiquetó debidamente con un número de protocolo asignado. Los tubos fueron almacenados hasta el momento de su utilización para la extracción del ADN genómico, el cual fue aislado usando QIAamp® ADN (QIAGEN, Hilden, Alemania). Posterior a la extracción de ADN se realizó la genotipificación del gen *CYP2D6*, utilizando PCR en tiempo Real (Real Time PCR) para la determinación de los alelos *CYP2D6\*2*, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*35* y *CYP2D6\*41* y PCR tradicional para la determinación del alelo *CYP2D6\*5* \*5 y para las duplicaciones del gen *CYP2D6XN*.

## **II.6 Instrumentos, aparatos y reactivos**

Para la determinación de las variantes alélicas del gen *CYP2D6*, se utilizaron diferentes metodologías basadas en la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction); la técnica de PCR tradicional para la determinación del alelo *CYP2D6\*5* y las duplicaciones del gen *CYP2D6XN* y la técnica de Real Time – PCR, para la determinación de los alelos *CYP2D6\*2*, \*3, \*4, \*6, \*10, \*35 y \*41. Para el aislamiento del ADN genómico, se utilizó el Kit QIAamp® ADN blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Las reacciones de PCR tradicional se amplificaron en un instrumento Mastercycler 384 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) y para las RT-PCR se utilizó el instrumento Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (7300 Applied Biosystems Real Time PCR System, USA) y su respectivo software de análisis de resultados (7300 System software Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System, USA).

Para la detección del alelo *CYP2D6\*5* y las duplicaciones *CYP2D6XN* se utilizó la mezcla de las enzimas Taq y Pwo AND Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GMBH, Germany); para la determinación de los alelos *CYP2D6\*2*, *\*3*, *\*4*, *\*6*, *\*10*, *\*35* y *\*41* se utilizó el súper mix Taq Man Universal PCR (Taq man® 2X Universal PCR Master Mix, Roche, Branenburg, USA) y los ensayos SNPs usados para el análisis de cada alelo fueron basados en Taq man SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA).

Los dNTPs fueron Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade (Roche Diagnostics GMBH, Germany) y los oligonucleótidos fueron adquiridos a MWG Biotech ([www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)). La agarosa utilizada para la elaboración de los geles fue adquirida a Panreac (Barcelona - España), siendo posteriormente visualizados por tinción con bromuro de etidio 10 µl/ml (Sigma S.A., Madrid, España) utilizando un transiluminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

## **II.7 Metodología**

### **II.7.1 Obtención de la muestra.**

A continuación se detalla el procedimiento a seguir, previo a la obtención de la muestra del voluntario sano.

1. Obtener el consentimiento informado de los voluntarios sanos.



2. Realizar la encuesta para recolectar los datos personales del voluntario y constatar que este no ha ingerido ningún medicamento en el transcurso de las dos últimas semanas.
3. Asignar un código a la muestra del voluntario sano.
4. Rotular el tubo con EDTA, con el código asignado al voluntario sano y proceder con la extracción.
5. Tomar una muestra de sangre en tubo con EDTA con la ayuda de un vacutainer. No olvidar homogenizar la muestra.

### **II.7.2 Codificación de los voluntarios sanos participantes**

Los códigos se asignaron en forma ordenada y ascendente, de acuerdo al avance en la recolección de las muestras. El código designado para cada voluntario sano consistió en identificar el sitio de proveniencia, con la inicial de la provincia correspondiente (Pichincha: P), una numeración arábica de tres dígitos, desde 001 hasta 207.

### **II.7.3 Conservación y transporte al laboratorio**

Los tubos con las respectivas muestras se transportaron en un contenedor aislante del calor, conteniendo paquetes de gel congelante, con el propósito de garantizar la cadena de frío (4°C) hasta llevarlas al Centro de Biomedicina.

#### **II.7.4 Almacenamiento de las muestras**

El almacenamiento de las muestras de sangre fue a 4°C, par mantener la cadena de frío hasta el momento de realizar la extracción de ADN.

#### **II.7.5 Aislamiento de ADN genómico.**

A continuación se detallan los pasos que se siguieron para la extracción de ADN mediante la utilización del Kit QIAamp® ADN Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Se partió de 200 µl de sangre total obtenida de cada voluntario sano.

1. Pipetear 20 µl de QUIAGEN Proteasa (Proteinasa K) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Añadir 200 µl de la muestra de sangre periférica al tubo de microcentrífuga. Si la muestra es menor a 200 µl, añadir el volumen apropiado de PBS.
3. Añadir 200 µl de la Buffer AL a la muestra. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
4. Incubar a 56° C por 10 minutos.
6. Añadir 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar nuevamente por vórtex durante 15 segundos. Después de la mezcla, centrifugar el tubo de 1,5 ml para remover las gotas presentes en las paredes.

7. Aplicar la mezcla realizada en el paso 6 a la columna QIAmp Mini Spin (en un tubo de colección de 2 ml). Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g o 8000 rpm por un minuto. Pasar la columna QIAmp Mini Spin a un tubo de colección limpio de 2 ml, y descartar el tubo que contenía el filtrado.

8. Abrir la columna QIAmp Mini Spin y adicionar 500 µl de Buffer AW1 sin humedecer el borde del tubo. Cerrar la tapa, y centrifugar a 6000 x g (8000rpm) por un minuto. Pasar la columna QIAmp Mini spin a un tubo limpio de colección de 2 ml, y descartar el tubo que contenía el filtrado.

9. Abrir la columna y adicionar 500 µl del Buffer AW2 y centrifugar a máxima velocidad (20,000 x g; 14,000 rpm) durante 3 minutos.

11. Pasar la columna QIAmp Mini Spin a un tubo de 1,5 ml; abrir la columna y añadir 200 µl de Buffer AE o agua destilada. Incubar a una temperatura de 15°-25° C durante 5 minutos y posteriormente centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por un minuto.

#### **II.7.6 Determinación de las duplicaciones del gen *CYP2D6*.**

Para determinar la existencia de duplicaciones en el gen *CYP2D6* se realizó una XL-PCR inicial. Se utilizaron los iniciadores 2D6dupl-F y 2D6dupl-R, que amplifican un fragmento de 3.5 Kb solo en aquellos individuos que presentaron más de una copia del gen en el mismo alelo (Lundqvist et-al, 1999).

En la misma PCR se amplificó un fragmento de 5.1 Kb que corresponde al tamaño del gen completo, mediante el “primer forward” (DPKup)

y el “primer reverse” (DPKlow) (Hersberger et-al, 2000). Las reacciones de 25  $\mu$ l se amplificaron en un Mastercycler 384 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) en tubos de pared fina de 0.2 ml. Se utilizaron 0.375  $\mu$ l de la mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerasa (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Germany). La amplificación de 50 a 100 ng/ $\mu$ l de DNA genómico humano se realizó con 2.5  $\mu$ l de PCR buffer 3 (2.75 mM MgCl<sub>2</sub>; Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Germany), 0.5 mM de cada dNTPs (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade, Roche Diagnostics GmbH, Germany) y 0.4  $\mu$ M de cada primer (Tabla II.1).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 94°C, seguidos de 10 ciclos de 20 seg a 95°C y 4 min a 68°C, 20 ciclos más aumentando 5 seg cada paso de 68°C, y una extensión final de 7 min a 68°C. El producto de la PCR se analizó directamente en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y el DNA se visualizó con bromuro de etidio.

Esta reacción de XL-PCR dio lugar a fragmentos de 5.1 kb, los cuales se utilizan para posteriores diagnósticos por PCR-RFLP y de 3.5 kb solo si existen alelos con multiplicaciones.

**Tabla II.1:** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados como primers.

Primers	Secuencia 5' a 3'	Referencias
DPKup	5' GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA 3'	Hersberger M et-al, 2000
DPKlow	5' GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA 3'	Hersberger M et-al, 2000
2D6dupl-F	5' CCTGGGAAGGCCCATGGAAG 3'	Lundqvist E et-al, 1999
2D6dupl-R	5' CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT 3'	Lundqvist E et-al, 1999
5'2D6dup	5' GCCACCATGGTGTCTTTGCTTTCCTGG 3'	Johansson I et-al, 1996
3'2D6dup	5' GGTTTCTTGGCCCGCTGTCCCCACTC 3'	Johansson I et-al, 1996
5'2D6*5	5' CACCAGGCACCTGTACTCCTC 3'	Steen VM et-al, 1995
3'2D6*5	5' CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC 3'	Steen VM et-al, 1995

### II.7.7 Detección del alelo *CYP2D6\*5*

Para determinar la presencia de *CYP2D6\*5*, se llevó a cabo una XL-PCR. Los primers utilizados para ello fueron 5'2D6\*5 y 3'2D6\*5 (Steen VM et-al, 1995), que son específicos para el alelo *CYP2D6\*5* (3.5 kb). Además, en la misma PCR, se amplifica el gen *CYP2D6* completo (5.1 kb) utilizando el primer "forward" DPKup y el "primer reverse" DPKlow (Hersberger M et-al, 2000). Las reacciones de amplificación, las condiciones y el análisis del DNA fueron las mismas que las utilizadas en la determinación de las multiplicaciones del gen *CYP2D6*.

### **II.7.8 Detección de las multiplicaciones de alelos *CYP2D6*\*1, \*2 ó \*4.**

Para todas las muestras de DNA que presentaron duplicaciones, se analizaron los alelos *CYP2D6*\*1xN, \*2xN y \*4xN usando 1 µl de la reacción de XL-PCR (diluido con H<sub>2</sub>O 1:10) amplificando un fragmento de 10 kb. Esta XL-PCR se llevó a cabo usando los primers 5'2D6dup y 3'2D6dup (Tabla II.1). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl en tubos de 0.2 ml de pared delgada y con 0.375 µl de mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

La amplificación de 50 a 100 ng/µl de DNA genómico humano se realizó con 2.5 µl de PCR buffer 2 (2.75 mM MgCl<sub>2</sub>; Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 0.5 mM de cada dNTPs (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade, Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y 0.3 µM de cada primer (Tabla III).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2min a 94°C, seguidos de 10 ciclos de 20seg a 95°C, 30seg a 59°C, 9min con 30seg a 68°C, seguidos de 20 ciclos más aumentando 10seg cada paso de 68°C, y una extensión final de 11min a 68°C. El producto de la PCR se analizó en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% y el DNA se visualizó con bromuro de etidio. Esta PCR creó un fragmento de 10 kb, el cual se utilizó para el diagnóstico por PCR-RFLP. Todas las reamplificaciones se llevaron a cabo para detectar los alelos *CYP2D6*\*1xN, \*2xN y \*4xN. La Tabla II.2 resume todas las reacciones de reamplificación realizadas.

**Tabla II.2:** Reacciones de amplificación y reamplificación realizadas para la determinación de variantes alélicas *CYP2D6\*5* y *CYP2D6XN*.

Forward Primers	Reverse Primers	PCR (bp)	Enzima de restricción	Resultados (bp)
DPKup, 2D6dupl-F	DPKlow, 2D6dupl-R			<b>Gen 2D6:</b> 5100 <b>*1, *2, *4 xN:</b> 3500
DPKup, 5'2D6*5	DPKlow, 3'2D6*5			<b>Gen 2D6:</b> 5100 <b>*5:</b> 3500
5'2D6dup	3'2D6dup			<b>*1, *2, *4 xN:</b> 10000
5'188 Scal	3'188Scal	241	Scal	<b>*4x2:</b> 206 + 35 <b>*4 :</b> 241

### II.7.9 Detección de los alelos *CYP2D6\*2, \*3, \*4, \*10, \*35 y\*41*.

Para determinar la prevalencia de los alelos *CYP2D6\*2, \*3, \*4, \*6, \*10, \*35 y \*41* se realizaron sucesivas Real Time – PCR.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que contenía 10µl de Taq Man Universal PCR (Taq Man® 2X Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Roche, Bronehburg, USA); 1 µl del correspondiente SNP Genotyping assay (Taq Man® Mix 20X SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, USA) (Ver Tabla II.3).

Las condiciones para las RT-PCR fueron: pre-read, durante 1min a 60°C, esto permite leer la fluorescencia de la placa antes de la amplificación. El segundo paso es la amplificación, que consiste en llevar las muestras a 95°C

durante 10 seg y luego a 92°C durante 15 seg, repitiendo este último paso 40 veces. Finalmente el pre-read que se realiza a 60°C durante 1 min, este permite comparar el pre-read con la amplificación para saber la cantidad de ADN amplificado, mediante la fluorescencia emitida por la muestra.

**Tabla II.3:** Detalle de los ensayos SNP Genotyping usados en el análisis de los alelos del *CYP2D6*.

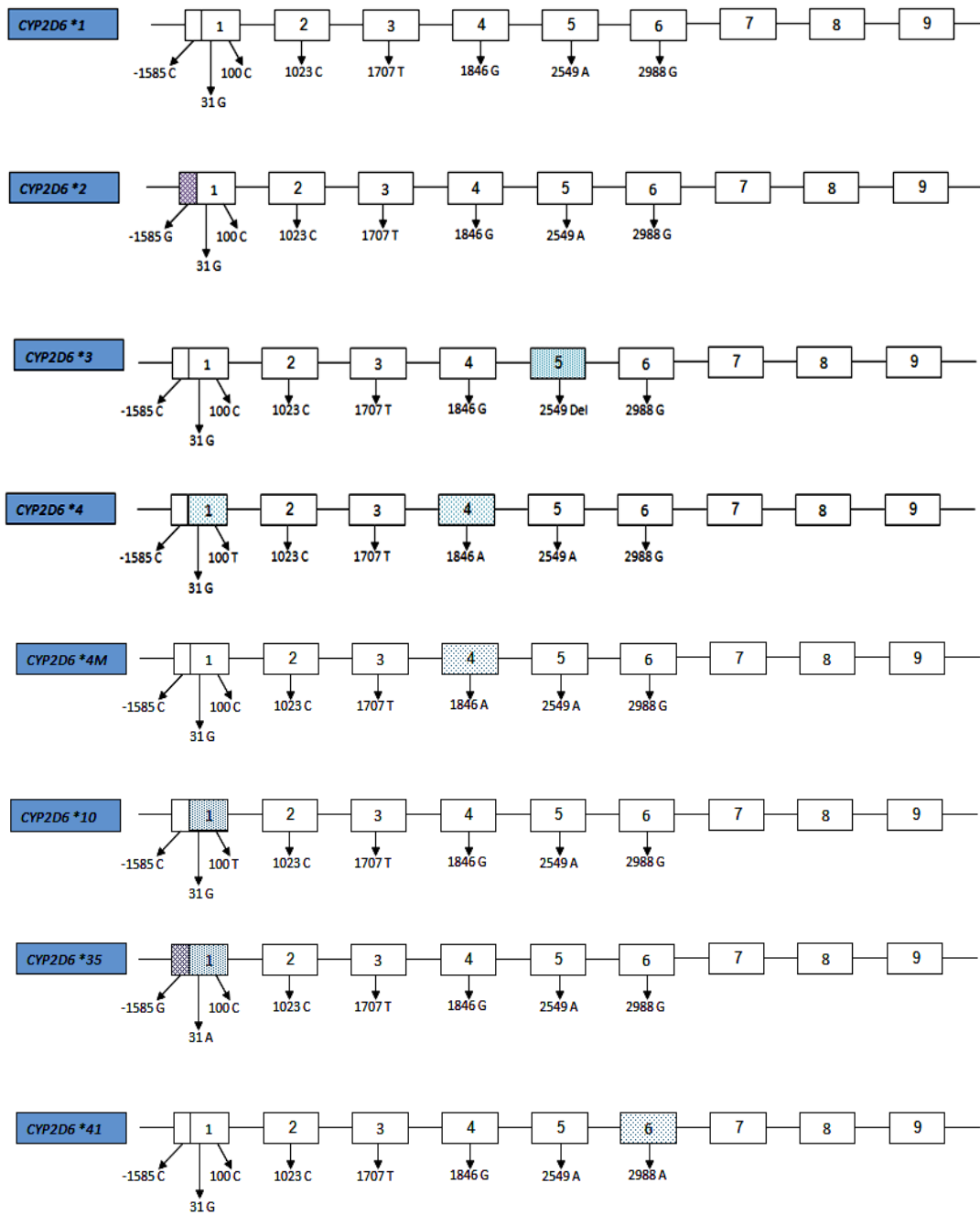
Alelos <i>CYP2D6</i>	SNP	ASSAY ID
<i>CYP2D6</i> *2	- 1584 C > G	C_32407252_30
<i>CYP2D6</i> *3	2549 del A	C_32407232_50
<i>CYP2D6</i> *4	1864 G > A	C_27102431_BO
<i>CYP2D6</i> *6	1707 T > del	C_32407243_20
<i>CYP2D6</i> *10	100 C > T	C_11484460_40
<i>CYP2D6</i> *35	31 G > A	C_27102444_80
<i>CYP2D6</i> *41	2988 G > A	C_34816116_20

## II.8 Método de Genotipificación

Una vez realizada la detección de todos los alelos presentes en el gen *CYP2D6*, ya sea mediante PCR tradicional y Real Time – PCR, se procedió a la determinación de los genotipos, con la ayuda de la siguiente figura.



**Figura II.2** Cuadro de genotipificación del gen *CYP2D6*



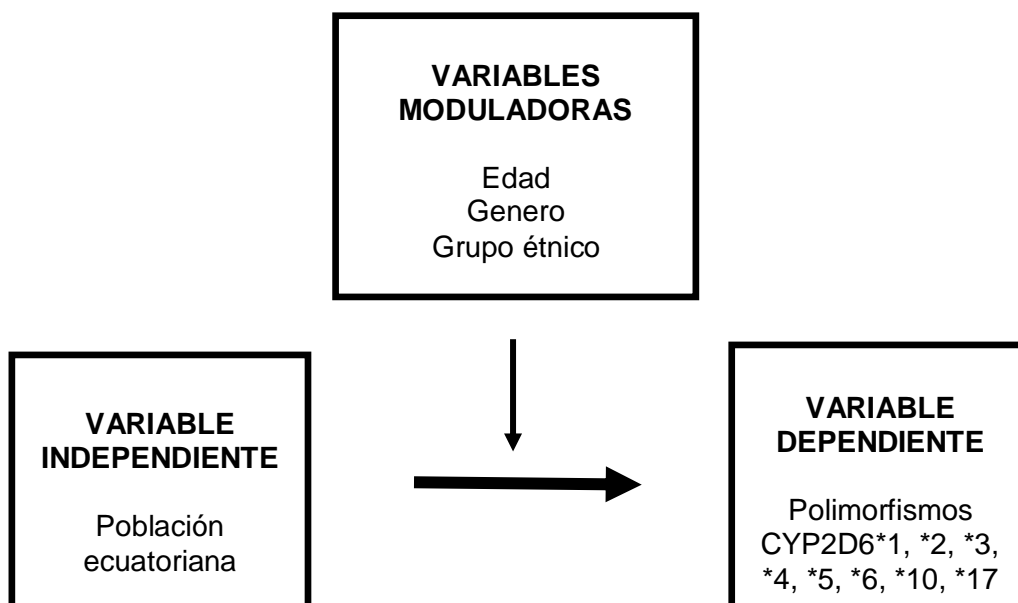
## II.9 Diseño bioestadístico

Los datos obtenidos a través de los formularios específicos, serán ingresados en una hoja electrónica desarrollada en Microsoft Excel, a partir de la cual se procederá a la realización de la estadística descriptiva de las variables cualitativas y cuantitativas.

Para el desarrollo de la estadística inferencial, los datos serán trasladados al paquete para análisis estadístico SPSS v. 15.5, teniendo planificada la utilización de estadística descriptiva para la obtención de las frecuencias genotípicas y alélicas; además mediante el uso de tablas de contingencia se comparará las diferentes variables a analizar.

## II.10 Definición de las variables a estudiar

Figura II.3: Definición de las variables a estudiar



**Tabla II.4:** Definición de Variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
<b>Población Ecuatoriana</b>	Grupo individuos que viven en la República del Ecuador y que son descendientes de nativos del mismo país.	Lugar de nacimiento	Positivo ó negativo	Si o No
<b>Polimorfismos CYP2D6</b>	Variedades alélicas en un solo nucleótido para el gen CYP2D6.	Nativo (wild type) o alterado.	<i>CYP2D6</i> *1, *2, *3, *4, *5, *10, *35, *41 y <i>XN</i>	Presente o ausente.
<b>Edad</b>	Tiempo que una persona vive.	Media	15 – 70 años	Años
<b>Género</b>	Especie que tiene características comunes.	Porcentaje	Hombre o Mujer	Si o No
<b>Grupo Étnico</b>	Agrupación natural de individuos de igual cultura.	Porcentaje	Mestizo, Indígena, Negro	Si o No

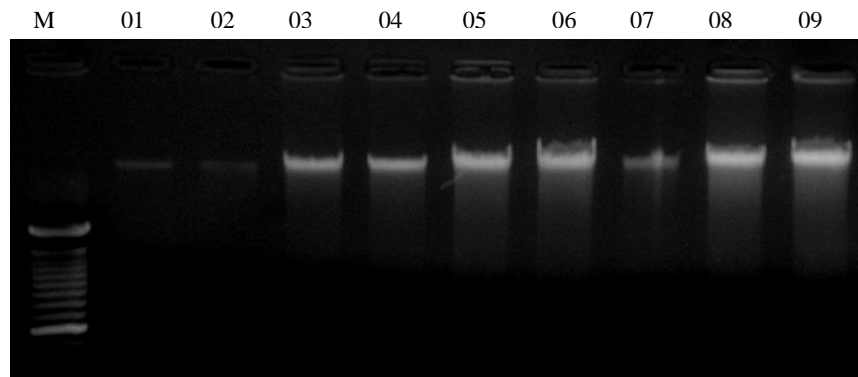
### III. RESULTADOS

### III.1 Aislamiento de ADN genómico

El proceso de extracción se llevo a cado utilizando el Kit QIAamp Mini Spin (QIAamp® ADN QIAGEN), partiendo de 200ul de sangre total, para comprobar la correcta extracción del ADN se realizó un gel de agarosa al 1.5%, utilizando bromuro de etidio como revelador, se dejo correr durante 20 min a 100 voltios y los resultados se muestran en la Figura III.1.

Para que la genotipificación se pueda llevar a cabo, el ADN obtenido de la extracción debe ser de muy buena calidad, de lo contrario la amplificación mediante XL-PCR no se llevara a cabo.

**Figura III.1:** Extracción de ADN genómico.



Comprobación de extracción de ADN usando el Kit QIAamp Mini Spin. Gel de agarosa al 1.5%, el marcador (M) usado fue de 1000pb y se utilizó bromuro de etidio como revelador.

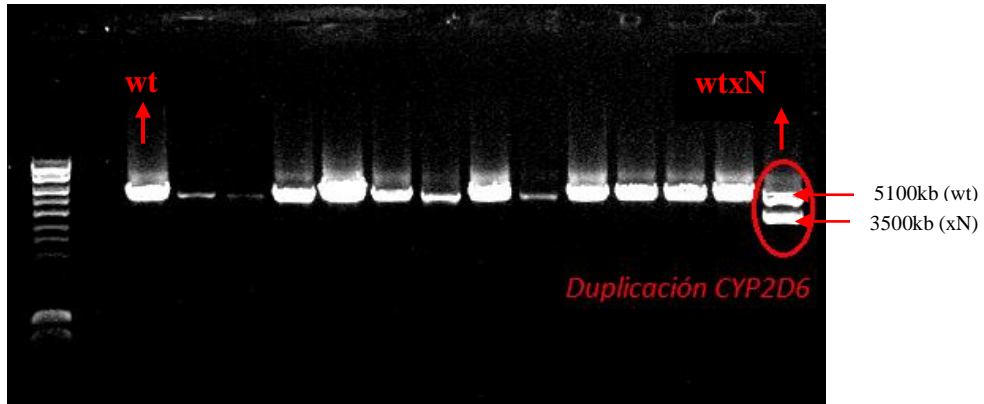
### III.2 Determinación de duplicaciones en el gen *CYP2D6*.

El método desarrollado en el presente proyecto de tesis permite detectar la delección *CYP2D6\*5* o la multiplicación del gen *CYP2D6*, siguiendo las mismas condiciones de amplificación para las reacciones. Aproximadamente 200 ng de DNA genómico fueron usados para la multiplex long PCR y los productos fueron separados en un gel de agarosa 0.8% durante 60 min, usando bromuro de etidio como revelador.

El procedimiento para la detección del alelo mutado *CYP2D6\*5* y para las duplicaciones son resumidas en la Figura III.3. El DNA genómico es amplificado en una XL-PCR, la reacción contiene dos juegos de primers (Tabla II.1). El primer juego de primers genera un fragmento de 5.1 Kb, el cual puede servir de template para futuras reacciones y es un comprobador que la amplificación se llevo a cabo correctamente; el segundo juego de primers genera un fragmento de 3.5 Kb, con el cual constamos la existencia de la multiplicación/ duplicación en el *CYP2D6*.

Es fundamental que la calidad del ADN template sea adecuada para que exista una correcta amplificación, es importante mencionar que las muestras 1, 35, 63, 72, 95, 96, 106, 142, 143, 153, 199 no pudieron ser amplificadas, por lo tanto no se pudo determinar la existencia de duplicaciones en las mismas.

**Figura III.2:** XL-PCR para detectar duplicaciones del gen *CYP2D6*.



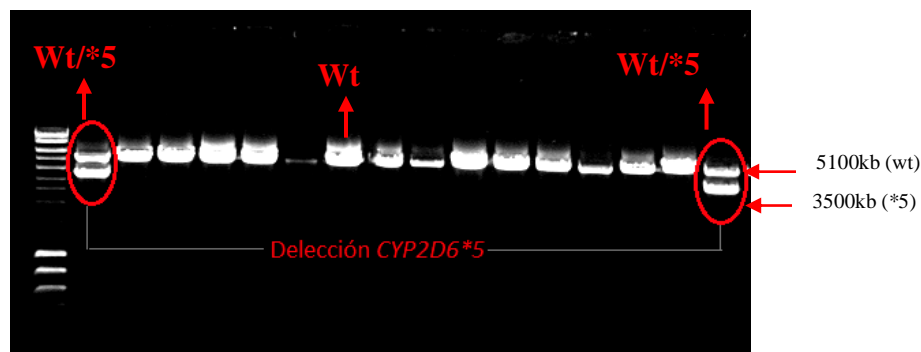
Se partió desde 200 ng aproximadamente de DNA genómico para la XL-PCR y los productos fueron separados en un gel de agarosa 0.8% durante 60 min. La figura muestra: en el primer carril el marcador molecular de 10000pb; el segundo carril no es determinable; las siguientes 13 muestras son homocigotos para el alelo wt/wt y en el último carril se puede ver 1 heterocigoto para la duplicación *CYP2D6xN*.

### III.3 Detección del Alelo *CYP2D6\*5*

Las condiciones para la reacción fueron las mismas que se utilizaron para detectar las duplicaciones del gen, descritas previamente en el capítulo de materiales y métodos. Como resultado de la amplificación tenemos un fragmento de 5100 pb, que corresponde al gen *CYP2D6* y en caso de existir deleción se amplifica un fragmento de 3500 pb, pudiéndose evidenciar los respectivos resultados en la Figura III.2.

En las muestras 1, 35, 40, 63, 72, 95, 96, 106, 142, 143, 153, 199, no se pudo determinar la existencia de la mutación *CYP2D6\*5*

**Figura III.3:** XL-PCR para detectar deleciones del gen *CYP2D6\*5*.

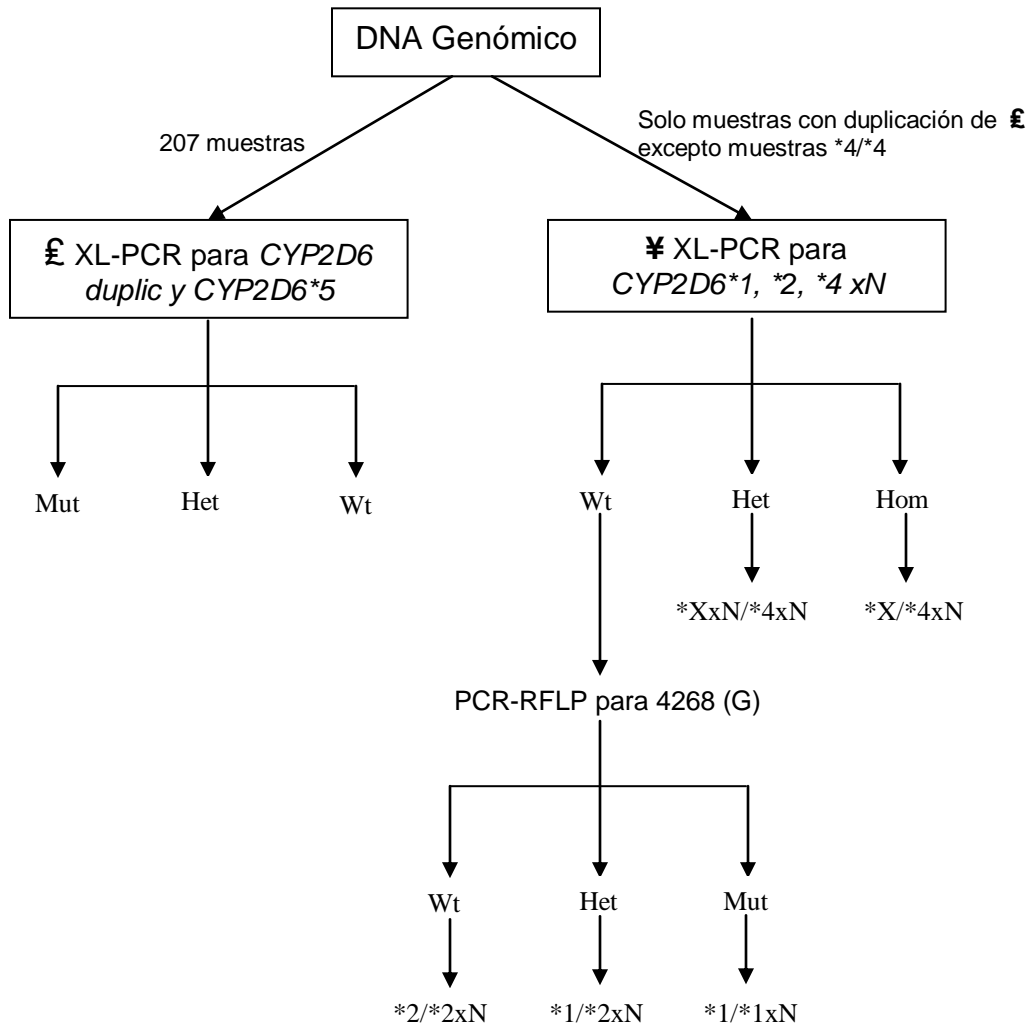


Se partió desde 200ng aproximadamente de DNA genómico para la XL-PCR y los productos fueron separados en un gel de agarosa 0.8% durante 60min. La figura muestra: 14 homocigotos para el alelo wt/wt y 2 heterocigotos para la mutación *CYP2D6*\*5.

#### III.4 Detección de las multiplicaciones de alelos *CYP2D6*\*1, \*2 ó \*4.

Todas las muestras que resultaron positivas para los alelos con multiplicación/ duplicación *CYP2D6*\*1, \*2, \*4 (con excepción del alelo homocigoto *CYP2D6*\*4), fueron amplificadas nuevamente, mediante una XL-PCR y usando los cebadores 5'2D6dup y 3'2D6dup, produciendo un fragmento de 10 Kb (Figura III.3 ¥), luego de esto se llevo a cabo una nueva reamplificación usando los primers 5'188Scal y 3'188Scal y la respectiva RFLP usando la enzima Scal, produciendo para el alelo mutante dos fragmentos de 206pb y 35pb. De esta forma pudimos identificar que alelo lleva la duplicación/multiplicación. De las 6 muestras que fueron positivas para la duplicación, únicamente una presento duplicación/multiplicación en el alelo \*4 (wt/4xN).

**Figura III.4:** Diseño de método para detectar Multiplicaciones/Duplicaciones y Delecciones del gen *CYP2D6*.



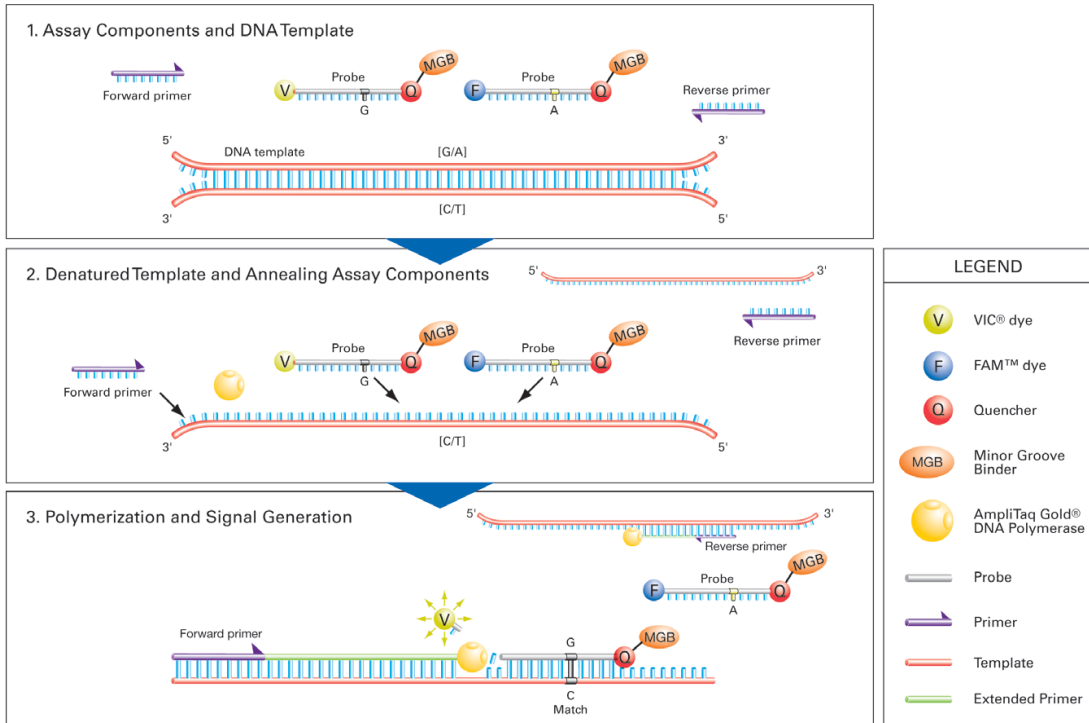
Procedimiento a seguir para determinar posibles multiplicaciones/duplicaciones y deleciones del gen *CYP2D6* empleando XL-PCR y RFLP-PCR. Wt: homocigoto sin ninguna mutación, Het: heterocigoto, Mut: mutante homocigoto, \*X: variante alélica *CYP2D6* diferente a \*4.

### III.5 Detección de los alelos *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*10, \*35 y\*41.



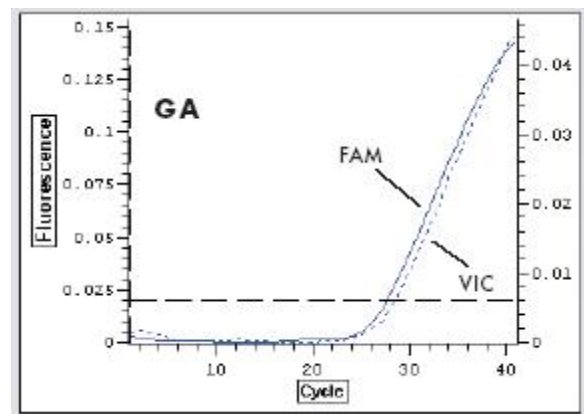
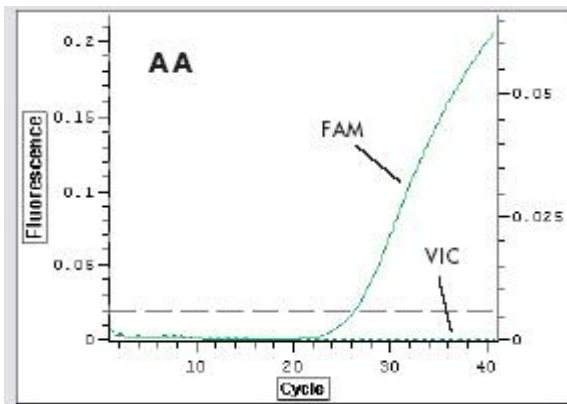
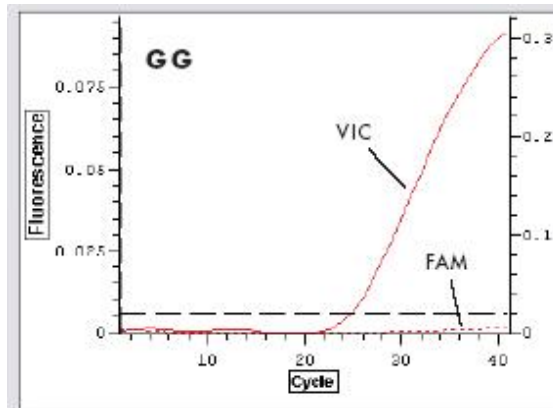
La detección de los alelos *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*10, \*35 y\*41, se llevo a cabo mediante Real Time – PCR, usando los ensayos SNP detallados en la Tabla II.3. Para el desarrollo de este protocolo se utilizó la súper mezcla TaqMan, que usa la propiedad 5´nucleasa de la Taq polimerasa y la especificidad de la sonda Taqman; las cuales hibridizan la región interna del ADN template durante el paso de annealing en cada ciclo de PCR. Un fluorocromo esta unido en el lado 5´-end de cada sonda Taqman (FAM  $\lambda_{max} \approx 518\text{nm}$  y VIC  $\lambda_{max} \approx 550\text{nm}$ ) y un agente bloqueador (TAMRA  $\lambda_{max} \approx 580\text{nm}$ ) a el lado 3´-end. El agente bloqueador extingue la fluorescencia del fluorocromo mientras la sonda Taqman permanezca intacta. Sin embargo la subsecuente hidrólisis de la sanda Taqman, produce que el agente bloqueador se separe y emita fluorescencia, la cual es medida gradualmente mientras se da el proceso de amplificación.

**Figura III.5:** Principio TaqMan® SNP Genotyping Assays – Real Time PCR



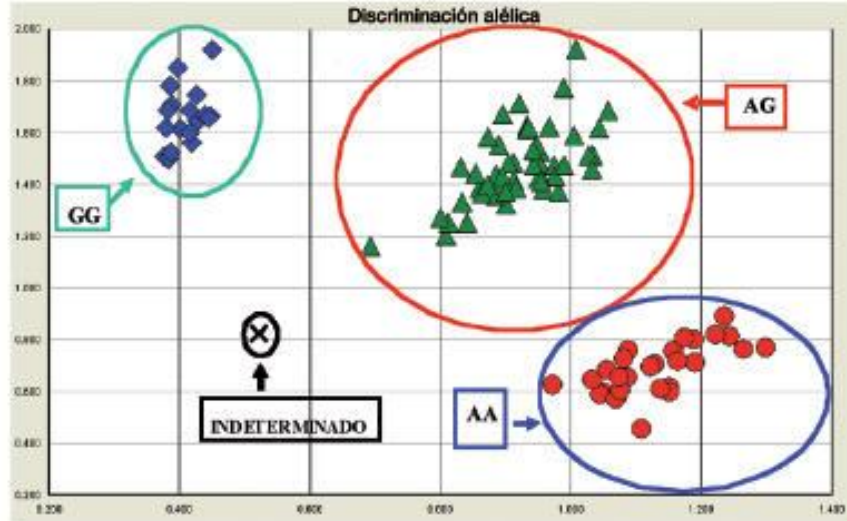
Previo al proceso de amplificación se asigna el respectivo código a las sondas VIC o FAM, por ejemplo VIC: Wild type, FAM: Homocigoto para la mutación analizada.

**Figura III.6:** Amplificación de las sondas VIC y FAM.



VIC: wild type; FAM: Homocigoto mutación; VIC y FAM: Heterocigoto.

**Figura III.7:** Resultado de la tipificación del polimorfismo genético mediante la tecnología Taqman en un 7300 Applied Biosystems Real Time PCR System.



Resultado de la discriminación alélica obtenida en el analizador 7300 Applied Biosystems Real Time PCR System, en muestras para el estudio del polimorfismo *CYP2D6\*4*. AA: wild type; AG: Heterocigoto; GG: homocigoto mutación *CYP2D6\*4*

### III.6 Análisis Bioestadístico.

Previo a la toma de muestra se procedió a la firma del respectivo consentimiento informado y a la realización de la encuesta para descartar enfermedades y la ingesta de medicamentos hace dos semanas atrás. En caso de existir voluntarios que no cumplieran los requisitos, estos fueron excluidos del estudio.

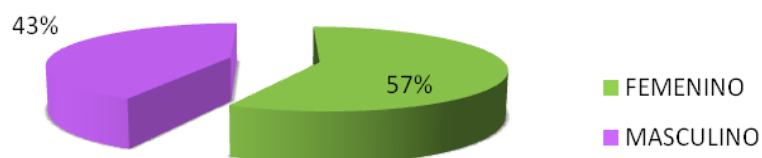
La Tabla III.1 detalla los datos correspondientes a edad, género, procedencia y grupo étnico, de las 207 muestras de voluntarios ecuatorianos sanos estudiados. Con respecto a la edad, todos los participantes eran mayores de 18 años, obteniéndose como media 25 años entre un rango de (18años –

67 años). En cuanto al género pudimos observar que el 58% (119 muestras) eran mujeres y el 42% (88) eran voluntarios del sexo masculino. Además la mayor parte de las muestras provenían de la provincia del Pichincha y el grupo étnico predominante es mestizo.

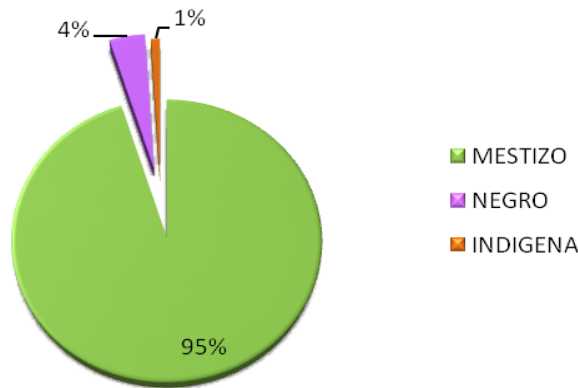
**Tabla III.1:** Datos Demográficos

<b>DATOS DEMOGRÁFICOS</b>	
Edad	25 ± 8,50 (18 - 67)
<b>Género</b>	
Femenino	119 (58%)
Masculino	88 (42%)
<b>Procedencia</b>	
Azuay	39 (19%)
Carchi	11 (5%)
Guayas	36 (17%)
Pichincha	121 (59%)
<b>Grupo Étnico</b>	
Mestizo	197 (96%)
Negro	8 (4%)
Indígena	2 (1%)

**Figura III.8:** Distribución de la población por género.



**Figura III.9:** Distribución de la población por grupo étnico.



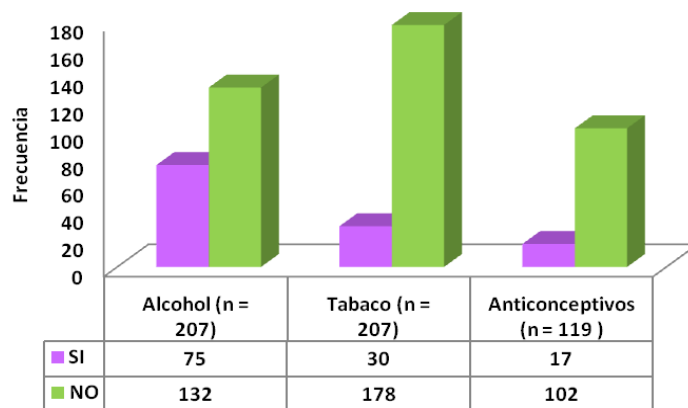
En la encuesta realizada previa a la toma de la muestra, se considero si los participantes tenían algún hábito de consumo, como ingesta de alcohol, cigarrillo y anticonceptivos, para el caso de las mujeres, esto con el fin de excluir alguna relación entre hábitos de consumo y el genotipo presente en los individuos estudiados.

En la Tabla III.2 se muestran los respectivos resultados y en el análisis estadístico, mediante la prueba de  $X^2$ , se descarto cualquier relación significativa entre las variables de hábito de consumo y los genotipos presentes en la población ecuatoriana.

**Tabla III.2:** Hábitos de Consumo

Hábitos	SI	NO
Alcohol (n = 207)	75 (36)	132 (64)
Tabaco (n = 207)	30 (14)	178 (86)
Anticonceptivos (n = 119 )	17 (14)	102 (86)

**Figura III.10:** Hábitos de Consumo



En este estudio se analizó la presencia de las tres variantes alélicas del gen *CYP2D6*, descritas como predominantes en las poblaciones blancas europeas (*CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*), en las asiáticas (*CYP2D6\*10*), además de las duplicaciones (*CYP2D6xN*, *CYP2D6\*4xN*) y de los alelos que pueden generar un metabolismo acelerado (*CYP2D6\*35*, *CYP2D6\*41*); según la metodología detallada en el capítulo de Materiales y Métodos.

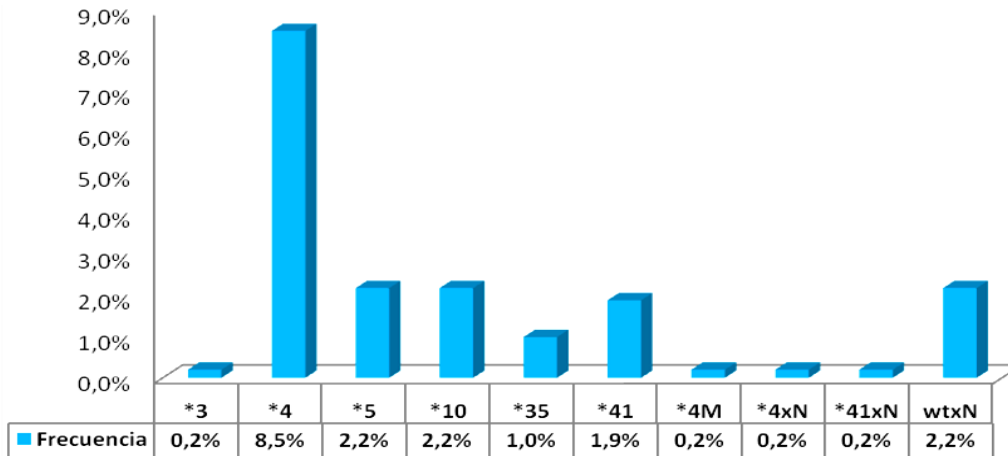
**Tabla III.3:** Frecuencias alélicas de *CYP2D6* en población ecuatoriana.

Alelos	Actividad	Población Ecuatoriana n = 414	Frecuencias Alélicas (%)
wt ó *2	Funcional	336	79,4
*3	No Funcional	1	0,2
*4	No Funcional	35	8,5
*5	No Funcional	9	2,2
*10	Disminuida	9	2,2
*35	Incrementada	4	1,0
*41	Incrementada	8	1,9
*4M	No Funcional	1	0,2
*4xN	No Funcional	1	0,2
*41xN	Incrementada	1	0,2
wtxN	Incrementada	9	2,2

En la Tabla III.3 se detalla en forma ordenada cada uno de los alelos estudiados y su respectiva funcionalidad, además se destaca la presencia del alelo *CYP2D6\*4M*, el mismo que no se ha reportado en ningún estudio anterior en población hispana, la actividad de este alelo es nula al igual que el alelo *CYP2D6\*4*, la diferencia entre los dos es el polimorfismo que los identifica, puesto que el alelo \*4 presenta un cambio en dos posiciones del genoma 100C/T y 1846G/A y el alelo \*4M únicamente en la posición 1846G/A.

**Figura III.11:** Frecuencias alélicas del gen *CYP2D6* en población sana ecuatoriana.





En la Tabla III.4 se detalla las frecuencias alélicas del gen *CYP2D6* y además se detalla el la base alterada para cada polimorfismo, donde se puede apreciar que en la mayoría de la población está presente el alelo wt (51.4%) y el alelo \*2 (28%), seguido por el alelo \*4 (8.5%).

**Tabla III.4:** Frecuencias alélicas del gen *CYP2D6* de 207 muestras de ecuatorianos sanos (n=414 alelos).

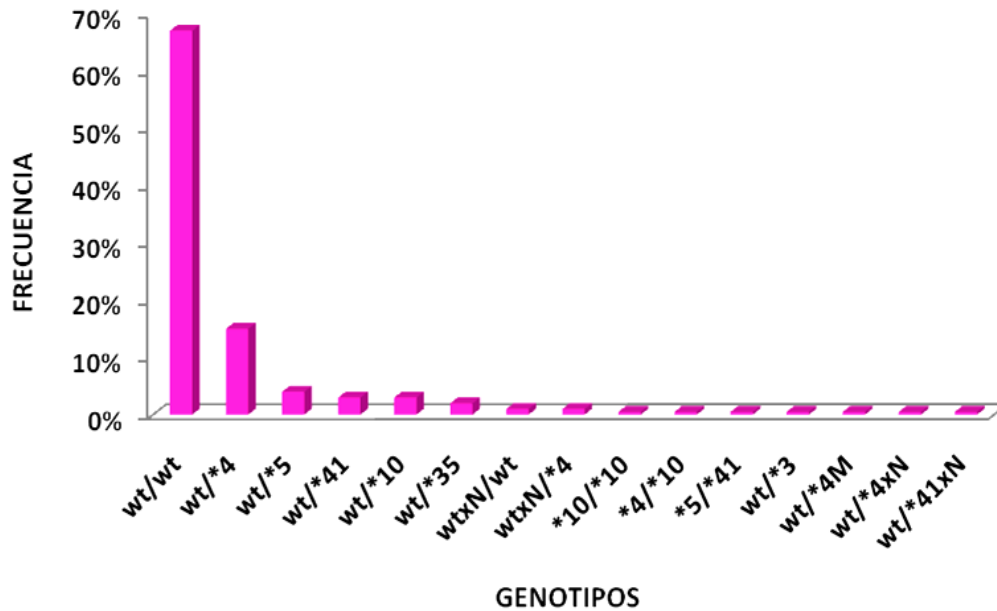
Alelos	-1585	31	100	1023	1707	1846	2549	2988	n	%	95% CL (%)
wt	C	G	C	C	T	G	A	G	213	51.4	46.6 – 56.3
*2	G	G	C	C	T	G	A	G	123	28	25.3 – 34.1
*3	C	G	C	C	T	G	Del	G	1	0.2	0.00 – 0.84
*4	C	G	T	C	T	A	A	G	35	8,5	5.8 – 11.3
*4M	C	G	C	C	T	A	A	G	1	0.2	0.00 – 0.84
*10	C	G	T	C	T	G	A	G	9	2.2	0.65 – 3.7
*35	G	A	C	C	T	G	A	G	4	1.0	0.1 – 2.00
*41	C	G	C	C	T	G	A	A	8	1.9	0.50 – 3.4
wtxN	CYP2D6*1 duplicado								9	2.2	0.65 – 3.7
*4xN	CYP2D6*4 duplicado								1	0.2	0.00 – 0.84
*41xN	CYP2D6*41 duplicado								1	0.2	0.00 – 0.84
*5	CYP2D6 delección								9	2.2	0.65 – 3.7

CI= 95% de Intervalo de Confianza.

**Tabla III.5:** Frecuencia de Genotipos del gen *CYP2D6* en población sana ecuatoriana.

GENOTIPOS	N	Frecuencia (%)
wt/wt	138	67
wt/*4	32	15
wt/*5	8	4
wt/*41	7	3
wt/*10	6	3
wt/*35	4	2
wtxN/wt	3	1
wtxN/*4	2	1
*10/*10	1	0,5
*4/*10	1	0,5
*5/*41	1	0,5
wt/*3	1	0,5
wt/*4M	1	0,5
wt/*4xN	1	0,5
wt/*41xN	1	0,5
Muestras	<b>207</b>	

**Figura III.12:** Frecuencia de Genotipos del gen *CYP2D6* en población sana ecuatoriana



En la Tabla III.6 se muestran los porcentajes de la población de voluntarios sanos estudiados. Observándose la mayor frecuencia del genotipo wt/wt (67%), seguido por el genotipo wt/\*4 (15%) y wt/\*5 (4%). Además podemos observar cuantos genes activos tienen cada genotipo presente en la población sana ecuatoriana. Es importante mencionar que en la población estudiada no se observó la existencia de ningún genotipo que genere un metabolismo lento (PM). Lo que si se encontró fue un genotipo que podría desencadenar una actividad disminuida de la enzima como son el \*10/\*10 y \*4/\*10. Existieron varias duplicaciones/ multiplicaciones del gen, pero solo una correspondía al alelo \*4xN/wt la cual podría influir en una disminución de la actividad metabólica y los genotipos \*41xN/wt y wtxN/wt que se cree podrían aumentar la actividad de la enzima, generando un metabolismo acelerado de los fármacos.

**Tabla III.6:** Frecuencia de Genotipos y número de genes activos *CYP2D6* en población sana ecuatoriana (n=207).

GENOTIPO	N genes activos	n	(%)	95% CI
wt/*3	1	1	0,5	0.46 – 1.42
wt/*4	1	32	15	10.5 – 20.4
wt/*4M	1	1	0,5	0.46 – 1.42
wt/*5	1	8	4	1.00 – 6.70
*4/*10	1	1	0,5	0.46 – 1.42
*5/*41	1	1	0,5	0.46 – 1.42
wt/*10	1	6	3	0.37 – 5.40
wt/*35	1	4	2	0.18 – 4.00
wt/*41	1	7	3	0.70 – 6.00
wt/*4xN	1	1	0,5	0.46 – 1.42
wt/wt	2	138	67	
*10/*10	2	1	0,5	0.46 – 1.42
wtxN/*4	2	2	1	
wtxN/wt	>2	3	1	
wt/*41xN	>2	1	0,5	0.46 – 1.42

n= 207 muestras; % porcentaje de genotipos; CI: intervalo de confianza.

#### IV. DISCUSIÓN

El método desarrollado en la presente Tesis es capaz de identificar los genotipos CYP2D6 de un gran número de individuos independientemente del grupo étnico al que pertenezcan. En este método se realizan una PCR y RFLP juntas, que permite alcanzar el 98% de especificidad en la determinación de las variante alélica *CYP2D6\*5* y las multiplicaciones/duplicaciones. Es importante mencionar que esta técnica de PCR no es capaz de diferenciar entre la duplicación o multiplicación en el gen *CYP2D6*, para identificar esto es necesario un análisis de Southern blot para determinar el número de genes presentes. Además se aplica la técnica de Real Time – PCR, mediante los cual se pudo identificar los alelos *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*35*, *CYP2D6\*41*.

La genotipificación del CYP2D6 es un instrumento útil en la medicina clínica, sin embargo, uno de los problemas que afrontan su empleo rutinario es su coste en términos de trabajo, equipos y reactivos. Un segundo aspecto es el referente a la frecuencia de distintos alelos en diferentes poblaciones. En la población mundial es cada día más frecuente la existencia de mezclas de distintas etnias, por otra parte la emigración es un hecho cada día más común. Por tanto, en esta situación sería conveniente disponer de una metodología que incluya la mayor cantidad posible de alelos CYP2D6 descritos.

Existen varias estrategias metodológicas para la determinación del genotipo CYP2D6, como SSCP (Single-strand conformation polymorphism) (Broly et-al, 1995; Marez et-al, 1997), PCR a tiempo real (Hiratsuka et-al, 2000; Molden et-al, 2002), análisis de microselección de DNA (microarrays for DNA analysis) (Murphy et-al, 2001; Chou et-al, 2003) o PCR a tiempo real TaqMan® (TaqMan real-time PCR) (Schaeffeler et-al, 2003). Sin embargo, muchos de ellos son caros o complejos, lo que impide su aplicación en muchos laboratorios del mundo.

Con el tiempo ha ido aumentando el consenso sobre el potencial uso de la farmacogenética en la práctica clínica, y los medios de comunicación reclaman la Medicina Personalizada en el mundo industrializado. Sin embargo, el uso de la farmacogenética para el desarrollo de la salud mundial ha sido cuestionado. Hay dos preocupaciones principales que pueden conducir a aumentar el “brecha biotecnológica” entre el mundo industrial y el tercer mundo: primero, la accesibilidad financiera de los países subdesarrollados a los métodos biotecnológicos habituales, y segundo, la imprevisibilidad de los genotipos de los diferentes grupos étnicos, que hace que para un paciente dado sea necesario analizar todos los alelos descritos.

Debido a su implicación en el metabolismo de gran número de fármacos de utilidad en la clínica, la enzima CYP2D6 es una de las candidatas mejores para la optimización de la terapéutica farmacológica de la salud global. Mediante la utilización de este tipo de métodos, se podría contribuir a paliar las diferencias en biotecnología existente entre el mundo industrial y el mundo subdesarrollado, ya que conociendo las diferencias genéticas existentes entre los distintos grupos étnicos se podrían diseñar estrategias de tratamiento específicas para las diferentes etnias, de forma que se pudieran reducir los fallos terapéuticos, así como las reacciones adversas al tratamiento de las diferentes enfermedades (Peñas-LLedó C, 2006).

El objetivo último sería contribuir desde la aplicación de la farmacogenética a la mejoría de la Salud Mundial. Para ello se necesitan métodos adaptables a cualquier circunstancia para evitar que el desarrollo biotecnológico diferencie cada día más a países ricos y pobres.

Es esencial determinar la prevalencia de polimorfismos del gen *CYP2D6* en cada población debido a que las frecuencias de las variantes alélicas son diferentes en cada grupo étnico, aunque el efecto de cada variante alélica sea el mismo en cada población (Leathart et-al, 1998). Aún cuando se han reportado más de 20 polimorfismos de *CYP2D6* causantes del fenotipo PM, la mayoría acurren de manera infrecuente y no resultan de relevancia práctica (Zenger et-al, 2004). Entre los más importantes que generan un PM el 95% corresponden a los alelos \*3, \*4, \*5 y \*6, en individuos caucásicos (Sachse et-al, 1997), siendo el alelo con mayor frecuencia el 2D6\*4, caracterizado básicamente por una sustitución de base G1934A entre el intrón tres y el exón cuatro (Hanioka et-al, 1990).

El genotipo wt/wt (67%) es el más frecuente en población ecuatoriana, seguido por el genotipo wt/\*4 (15%) y en porcentaje menor los genotipo wt/\*5 (4%) y wt/\*10 (3%), frecuencias muy similares a los obtenidos por Sosa et-al, 2006, en población mestizo-mexicana donde el genotipo wt/wt (73.6%) y wt/\*4 (17.3%). Aunque el estudio en población mestizo mexicana si se reporto un genotipo para metabolizadores lentos (PM) \*4/\*4 (3.6%), en población ecuatoriana no se encontró este genotipo. Algo que si se pudo reportar en este estudio es la presencia de multiplicaciones/ duplicaciones del gen *CYP2D6* principalmente en el alelo wt/wtxN (1%) y en alelo wt/\*4xN (1%).

Se procedió a la comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio con los resultados reportados en otros estudios realizados en población hispana presentados en la Tabla IV.1. La distribución de las frecuencias alélicas obtenidas en este trabajo fueron tomadas como referencia para ser comparadas con diferentes poblaciones empleando la prueba de Chi-cuadrado (Tabla IV.1). En las frecuencias marcadas con (\*) se encontraron diferencias significativas al comparar con las frecuencias reportadas para otras poblaciones ( $p < 0.05$ ).

**Tabla IV.1:** Frecuencias Alélicas *CYP2D6* en Poblaciones Hispanas.

Estudio	*3	*4	*4x2	*5	*6	*10	*17	*1 ó *2x2
Blanco – España (142) <sup>1</sup>	0	0.169*	0.007	0.014	0.067	0.021	0	0.039*
Embera (136) <sup>2</sup>	0	0.140*	NS	0	0.011	0.069*	NS	NS
Mapuche (84) <sup>3</sup>	0	0.036	NS	0.042	NS	0.018	0	0
Mestizo – Colombia (121) <sup>4</sup>	0.012	0.194*	0.004	0.008	NS	NS	0.016	0.008
Mestizo – México (110) <sup>5</sup>	0.009	0.131	NS	NS	0	0.023	NS	NS
Mestizo – México (264) <sup>5</sup>	0.002	0.100	NS	0.017	0.004	0.028	0.002	0.008
Mestizo –	0.014	0.112	NS	0.027	NS	0.125*	0.017	0.128*

<b>México (243)</b> <sup>6</sup>								
<b>Mestizo – México (349)</b> <sup>7</sup>	0.003	0.103	NS	0.023	NS	0.074*	0.007	0.010
<b>Ngawbe (105)</b> <sup>2</sup>	0	0.171*	NS	0	0.005	0.175*	NS	NS
<b>Tepehuano (85)</b> <sup>5</sup>	0	0.006*	NS	NS	0	0	NS	NS
<b>Estudio Actual (207)</b>	0.002	0.085	0.002	0.022	NS	0.022	NS	0.012

NS: No Estudiados \* Diferencias estadísticamente significativas.

1. Llerena et-al, 2006; 2. Jorge et-al, 1999; 3. Muños et-al, 1998; 4. Isaza et-al, 2000; 5. Sosa Macías et-al, 2006; 6. López et-al, 2005; 7. Mendoza et-al, 2001

Al comparara los resultados obtenidos con otras poblaciones hispanas, se puede observar que la presencia del alelo *CYP2D6\*3* (0.2%) es igual a la presentada en población mestizo-mexicana (0.2%) (Sosa Macías et-al., 2006; Mendoza et-al., 2001), pero comparada con otros estudios realizados en población colombiana (1.2%) (Isaza et-al, 2000) y población mexicana (1.4%) (Lopes et-al, 2005) la frecuencia reportada en este estudio es mucho menor. Es importante recalcar que en estudios realizados en población amerindia como Embera Mapuche, Ngawbe y Tepehuano no se reportó la presencia de este alelo (Jorge et-al, 1999; Muños et-al., 1998; Sosa Macías et-al., 2006).

La mutación causante del fenotipo PM más frecuente fue el alelo *CYP2D6\*4*, la frecuencia de este alelo fue encontrada similar a aquellas reportadas para poblaciones europeas (Llerena et-al., 2006; Sachse et-al., 1997; Gaikovitch et-al., 2003; Scordo et-al., 2004; Crescenti et-al., 2007), así como en poblaciones latinoamericanas de Colombia y México (Isaza et-al., 2000; López et-al., 2005). Mientras que para poblaciones europeas las frecuencias para este alelo están entre (15% - 21%), en Colombia (19.4%) y en México (11.21%), en el presente estudio, la frecuencia del alelo *2D6\*4* fue encontrada en 8.5%, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas. En contraste, la frecuencia del alelo *2D6\*4* reportado en este estudio es superior a la encontrada en poblaciones asiáticas que está considerada entre (0 - <1%) (Bradford, 2002). En cuanto a poblaciones Amerindias, como Mapuche de Chile la frecuencia del alelo *2D6\*4* (3.6%) (Muños et-al., 1998) es baja en



comparación a la reportada en el presente estudio y parecida en comparación con poblaciones Amerindias Ngawbe, Embera (17.1% y 14% respectivamente) (Jorge et-al., 1999).

De acuerdo al estudio de Jorge et-al. (1999), la presencia del alelo *2D6\*4* en Amerindios sugiere que el mismo tiene una historia evolutiva más antigua de lo que se pensaba. La alta influencia genética de blancos caucásicos en el presente estudio es consistente con la mezcla genética reportada en estudios previos de mexicanos y amerindios mexicanos (Sosa Macías et-al., 2006; López et-al., 2005; Mendoza et-al., 2001).

Según Sosa Macías et-al (2006), la población cosmopolita de grandes ciudades latinoamericana como México, derivan de una mezcla de genes provenientes de tres fuentes principales: mayoritariamente Españoles europeas (50% - 60%), amerindias (37%-49%) y en una minoría de contribución africana (1% - 3%) (Lisker et-al., 1986; Cerda-Flores et-al., 2002).

Hanis et-al. (1991)<sup>46</sup> reporta una similar herencia para americanos-mexicanos en Estados Unidos donde el 31% corresponde a nativos americanos, 61% derivado de españoles y 8% derivado de africanos. La herencia genética ancestral describe ser prominentemente europea, seguido por indios nativos y africanos ancestrales. Sin embargo en otras ciudades de América latina la herencia africana ancestral es muy alta; por ejemplo la mezcla de nativos de Puerto rico y Cuba reporta ser del 46% africana, 4% amerindia y 50% española (Bertilsson et-al., 1996).

Con respecto al alelo no funcional *CYP2D6\*5*, podemos ver que la frecuencia (2.2%) obtenida en el presente estudio es muy similar a la encontrada en estudio de población mestizo-mexicana realizados por Sosa Macías et-al., 2006; López et-al., 2005; Mendoza et-al., 2001 (1.7%, 2.7% y 2.3% respectivamente), esta frecuencia esta dentro del rango reportada para población caucásica (2%-7%) (Bradford, 2002). El alelo *CYP2D6\*5*, está asociado directamente con el fenotipo PM, al igual que los alelos *CYP2D6\*3* y *CYP2D6\*4*; por lo tanto una disminución en la actividad metabólica de la enzima.

Otro alelo *CYP2D6* asociado con un decremento de la actividad enzimática es el *CYP2D6\*10*. En blancos caucásicos la frecuencia de este es de 2.1% (Llerena et-al., 2006), similar a la encontrada en población ecuatoriana (2.2%); en comparación con otras poblaciones latinoamericanas como mestizo-mexicano y amerindias como tribus Embera y Ngawbe no existe diferencia estadísticamente significativa, ya que las frecuencias encontradas son 12.5, 7.4, 6.9% y 17.5 respectivamente (Jorge et-al., 1999; López et-al., 2005; Mendoza et-al., 2001). En contraste en población asiática la frecuencia del alelo *CYP2D6\*10* excede el 50% y es el responsable de un decremento en la actividad metabólica de la enzima, siendo en promedio más bajo el metabolismo de drogas por población asiática que por blancos caucásicos (Wang et-al., 1993).

La multiplicación/ duplicación de alelos *CYP2D6\*1* ó *\*2 (wt)* ha sido estudiado en algunas poblaciones, mientras que la multiplicación/ duplicación del *CYP2D6\*4* solamente ha sido evaluada en dos poblaciones (colombiana y española) (Tabla IV.1). Los individuos estudiados mostraron un porcentaje de 1.2% de multiplicación de alelos *CYP2D6* con actividad normal, comprendido entre el rango 0.8% y el 12.8% de mestizos colombianos y mexicanos respectivamente. Entre las poblaciones blancas, este porcentaje es muy similar

alrededor del 4% y el porcentaje de multiplicación de alelos inactivos *CYP2D6\*4* fue (0.2%), inferior al reportado en todas las poblaciones estudiadas (0.4%-0.7%) (Llerena et-al., 2006; Isaza et-al., 2000).

Los españoles, amerindios Ngawbe y una población de mestizos mexicanos mostraron las frecuencias más altas para alelos *CYP2D6* con actividad nula, disminuida y aumentada respectivamente (Llerena et-al., 2006; Jorge et-al., 1999; López et-al., 2005). Lo más significativo es la alta diversidad de frecuencias alélicas *CYP2D6* entre poblaciones mestizo-mexicanas, lo cual indica una gran variabilidad de mezcla en estos grupos.

Con respecto a los alelos *CYP2D6\*35* y *CYP2D6\*41*, con una actividad normal y decrecida, respectivamente, presentaron una frecuencia de 1% y 2%, además pudimos identificar una duplicación en el alelo *CYP2D6\*41*, que podría contribuir a un metabolismo disminuido de la enzima. Comparando los resultados se puede ver que la frecuencia reportada en este estudio es mucho menor que los obtenidos en otros estudios realizados en población Caucásica (7.4%) y americanos africanos (9.4%) (Gaedigk et-al., 2002).

Se realizó el respectivo estudio estadístico para ver la influencia de los factores ambientales como son el consumo de alcohol, bebidas alcohólicas y el uso de anticonceptivos y no se pudo determinar influencia estadísticamente significativa de estos sobre los genotipos, por lo tanto es muy importante analizar estos factores y su relación fenotipo-genotipo en población ecuatoriana.

## **V. CONCLUSIONES**

En conclusión los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran la existencia de polimorfismo genéticos de *CYP2D6* en la población

de voluntarios sanos ecuatorianos, además nos da la pauta para futuros estudios que muestren la diferencia interétnica con respecto a los polimorfismos en el gen *CYP2D6* en la población ecuatoriana. Este también ofrece la oportunidad de futuros estudios que busquen polimorfismos genéticos en los principales grupos étnicos de Ecuador.

En este estudio se comprueba que la frecuencia de alelos \*4 (8.5%) y \*5 (2.2%) es similar a la reportada en estudios en población caucásica y mestizos hispanos; sin embargo no se encontraron genotipos que desencadenen un fenotipo PM (metabolismo lento), pero si genotipos que reducen la actividad de la enzima como son \*10/\*10, \*4/\*10, \*5/\*41 y wt/\*41.

No existió relación estadísticamente significativa entre el genotipo y los factores ambientales como son alcohol, cigarrillo y el uso de anticonceptivos.

La aplicación del método de genotipificación descrito en este estudio, usando Real Time-PCR, XL-PCR y RFLP permite la detección de polimorfismos del gen *CYP2D6* con un 98% de especificidad en la determinación de los alelos que desencadenen un fenotipo PM. Es además muy útil porque es muy fácil incluir un protocolo que permita la detección de otras mutaciones en el gen.

Estimaciones revelan que entre el 20 y 25% de todas las drogas de uso clínico son metabolizadas al menos en parte por *CYP2D6* (Evans y Relling, 2004). Esta enzima responde por solo un pequeño porcentaje de todo el metabolismo hepático del Citocromo P450, pero su papel en el metabolismo de fármacos es mucho mayor que su contenido relativo (Zanger et al., 2004). Los individuos que presentan una combinación de dos alelos MP muestran una

actividad disminuida de esta enzima en las cuales la eliminación de la droga es dependiente de CYP2D6 (Ingelman-Sundberg, 2005). Cuatro de estos alelos, \*3, \*4, \*5 y \*6, causan el 93-97% de los fenotipos MP en la población caucásica (Sachse et al., 1997).

*CYP2D6* es crucial en el metabolismo de drogas, por ello existe la necesidad de estudios de farmacogenética con muestras grandes en cada población. Debido a que la población ecuatoriana es fundamentalmente de carácter mixto, aún más se torna relevante la evaluación de las variantes alélicas de varios Citocromo P450. La determinación de los alelos PM \*3, \*4 y \*5 de *CYP2D6*, incluyendo otros que serán analizados en el futuro, facilitará su uso en la práctica clínica asistiendo al desarrollo de una farmacoterapia individualizada.

El estudio del polimorfismo del *CYP2D6* puede ayudar a la elección del tratamiento adecuado para cada grupo de pacientes, siempre que las pautas de prescripción se utilicen de manera correcta (principalmente monoterapia). De esta forma sería posible prevenir efectos adversos y fallos terapéuticos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Realizar la genotipificación del alelo *CYP2D6*\*6 y *CYP2D6*\*17, ya que este último se expresa principalmente en población negra.
- Determinar en diferentes grupos étnicos del Ecuador el genotipo existente y comprobar si varía la expresión del mismo entre poblaciones.

- Realizar un estudio de relación feno-genotipo y factores ambientales en población ecuatoriana sana, de modo que se compruebe que el genotipo coincida con el fenotipo expresando por el individuo.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agúndez JA; Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J. (1995). Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther.*; Vol 57(3):265-69.
2. Agúndez, J.A., Ramíre, R., Hernández, M., Llerena, A., Benítez, J. (1997). Molecular heterogeneity at the CYP2D gene locus in Nicaraguans: impact of gene.flow from Europe. *Pharmacogenetics*; 337-340.
3. Aklillu E, Persson I, Bertilsson L et al. (1996). Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 278, 441–446.
4. Alanis, R., Llanes, I., Sosa, M., Alvarez, F., & Lazalde, B. (2007). Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México. *Medigrafic* Vol IX Num. 2 , 100-103.

5. Bathum L, Johansson I, Ingelman-Sundberg M et al. (1998). Ultrarapid metabolism of sparteine: frequency of alleles with duplicated CYP2D6 genes in a Danish population as determined by restriction fragment length polymorphism and long polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics Vol 8*, 119–123.
6. Bernal ML, Sinues B, Johansson I et al. (1999). Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics Vol 9*, 657–660.
7. Benny, K. A., & Adithan, C. (2001). Genetic Polymorphism of CYP2D6. *Indian Journal of Pharmacology Vol. 33*, 147-169.
8. Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, LLerena A, Alm C, Bondesson U, Lindstrom L, Rodriguez de la Rubia I, Ramos S, Benitez J. (1994). Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol; Vol 38(5):471-3*.
9. Bertilsson L, Dahl ML, Ekqvist B, LLerena A. (1993b). Disposition of the neuroleptics perphenazine, zuclopenthixol, and haloperidol cosegregates with polymorphic debrisoquine hydroxylation. *Psychopharmacol Ser.; Vol 10:230-7*.

10. Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Aberg-Wistedt A, Humble M, Johansson I, Lundqvist E, (1993a) Ingelman-Sundberg M Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. Lancet; 2;341(8836):63.
11. Bertilsson L. (1995). Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. Clin Pharmacokinet; Vol 29(3):192-207.
12. Bertilsson, L., Dahl, M., Dalén, P., & Al-Shurbaji, A. (2002). Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. Clin Pharmacol Vol. 53 , 111-122.
13. Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffeta P, Bonchardy C, Butkiewicz P, et al. (2002). Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. Carcinogenesis Vol. 23,1343-1350.
14. Bernard, S., Neville, K.A., Nguyen A.T., Flockhartb, D.A. (2006). Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. The Oncologist Vol. 11, 126-135.
15. Bradford, L. (2002). CYP2D6 allele frequency in European caucasians, Asians, Africans and their descendants. . Pharmacogenomics Vol. 3 , 229-243.



16. Broly F, Marez D, Sabbagh N, Legrand M, Millecamps S, Lo Guidice JM, Boone P, Meyer UA. (1995). An efficient strategy for detection of known and new mutations of the CYP2D6 gene using single strand conformation polymorphism analysis. *Pharmacogenetics*; Vol 5:373-84.
17. Cáceres León, M.C. (2006). Farmacoepidemiología y farmacogenética de la esquizofrenia. Tesis Doctoral Universidad de Extremadura.
18. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, et al. (1991). Genetic admixture in three Mexican Mestizo population based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Hum Biol*; Vol 14:257-263.
19. Chavarría, M., Araujo, M., Cortés, E., & González, J. (2002). El impacto del proyecto del genoma humano en la salud de la mujer. *Cirugía y Cirujanos* Vol. 70 Num. 3, 188-193.
20. Chou WH, Yan FX, Robbins-Weilert DK, Ryder TB, Liu WW, Perbost C, Fairchild M, de Leon J, Koch WH, Wedlund PJ. (2003). Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. *Clin. Chem*; Vol 49:542-551.
21. Clarke, S.E. (1998). In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica* Vol. 28, 1167-1202.

22. Collins, F., & Mckusick, V. (2001). Implications of the human genome project for medical science. *JAMA* Vol 285 , 540-544.
23. Crescenti, A. (2007). Estudio de la Relación de los Polimorfismos de los genes ECA, COMT y CYP2D6 con el riesgo de desarrollar síntomas extrapiramidales por antipsicóticos y el riesgo de esquizofrenia. . 1-224.
24. Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. (1995) Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*; Vol 274(1): 516-20.
25. Daly A.K., Armstrong M., Idle J.R. (1990). Molecular genotyping to predict debrisoquine hydroxylation phenotype. *Lancet*; Vol 336: 889-890.
26. Donato, M.T. (2007). ¿Qué es el citocromo P450 y como funciona? Pag: 29-62.
27. Dorado P.(2003). Estudio del citocromo CYP2C9 en la población española: implicación en el metabolismo de fármacos en voluntarios sanos y en pacientes psiquiátricos. *Tesis Doctoral - Universidad de Extremadura*.
28. Eichelbaum M, Bertilsson L, Sawe J, Zekorn C.(1982) Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther*;31(2):184-6.

- 29.** Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ.(1979) Influence of the defective metabolism of sparteine on its pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol*;16(3):183-7.
- 30.** Eichelbaum, M., baur, M.P., Dengler, H.J., Osikowska-Evers, B.O., Tieves, G., Zekorn, C., Rittner, C. (1987). Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol*; Vol 23: 455-458.
- 31.** Evans, W.E., Relling, M.V., Rahman, A., McLeod, H.L., Scott, E.P., Lin, J.S. (1993). Genetic basis for a lower prevalence of deficient CYP2D6 oxidative drug metabolism phenotypes in black americans. *J Clin Invest*; Vol 91: 2150-2154.
- 32.** Foltynie, T., Sawcer, S., Brayne, C. & Barker, R.A. (2002) The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 363-370.
- 33.** Gaedigk, A., Bradford, L.D., Marcucci, K.A., Leeder, J.S. (2002). Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black americans. *Clin Pharmacol Ther*; Vol 72: 76-89.
- 34.** Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. (1991). Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug

metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*; Vol 48(5):943-50.

35. Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. (1999). Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*; Vol 9:669-82.
36. González, F.J., Vailbois, F. Hardwick, J.P., McBride, O.W., Gelboin, H.V., Meyer, U.A. (1988). Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cADN and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*; Vol 2: 174-179.
37. González, F.J., Meyer, U.A. (1991). Molecular genetics of the debrisoquine-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*; Vol 50: 233-238.
38. Gonzalez FJ. (1992). Human cytochromes P-450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*.; Vol 13:346-52.
39. González , F. (2006). Ensayos médicos sobre genética, Aproximación breve al genoma Humano y los polimorfismos genéticos. *Research, Health & Medicine*. 1-32.

40. Gordillo, E. P. (2008). Los Polimorfismos genéticos del Citocromo P450y su relevancia en el metabolismo de xenobióticos.*Infármate* Vol 4, Num. 21-22, 2-16.
41. Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén, Eichelbaum M. (1998). Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*; Vol 8:15-26.
42. Griese E.U., Asante-Poku, S., Ofori-Adjei, D., Mikus, G., Eichelbaum, M. (1999). Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics*; Vol: 9: 715-723.
43. Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M.(1993). Expression of human cytochrome P-450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology*. Vol 82:21-37.
44. Guttmacher, A.E., Collins, F.S. (2002). Genomic medicine—a primer. *N Engl J Med*. Vol 347, 512-520.
45. Hanis CL, Hewett-Emmett D, Bertin TK, Schull WJ. (1991). Origins of U.S. Hispanics: implications for diabetes. *Diabetes Care*; Vol 14: 618-627.

46. Hanioka N., Kimura S., Meyer U.A., González F.J. (1990). The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934 a base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genetic* ; Vol 47: 994-1001.
47. Hasler JA. (1999). Pharmacogenetics of cytochromes P-450. *Mol Aspects Med*; Vol 20:12-137.
48. Heim M, Meyer UA. (1990). Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet*; Vol 336(8714):529-32.
49. Heim , M.H., Meyer, U.A. (1991) Genetic polymorphism of debrisoquine oxidation: restriction fragment analysis and allele –specific amplification of mutatio alleles CYP2D6. *Methods Enzymol*; Vol 206: 173-183.
50. Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E. (2000). Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*; Vol 46:1072-77.
51. Hiratsuka M, Agatsuma Y, Omori F, Narahara K, Inoue T, Kishikawa Y, Mizugaki M. (2000). High throughput detection of drug-metabolizing enzyme

polymorphisms by allele-specific fluorogenic 5' nuclease chain reaction assay. *Biol Pharm Bull*; Vol 23:1131-5.

**52.** Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, et al.(2004). GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer*.; Vol 110, 598-604.

**53.** Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit*; Vol 19(4), 333-341.

**54.** Ingelman-Sundberg, M. (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol*; Vol 25:193–200.

**55.** Isaza, C.A., Henao, J., López, A.M., Cacabelos, R. (2000). Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; Vol 22: 695-705.

**56.** Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol. Pharmacol*;46:452–9.

- 57.** Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*;90(24):11825-9.
- 58.** Jorge, L.F., Eichelbaum, M., Griese, E.U., Inaba, T., Arias, T.D. (1999). Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbw and Embera amerindians of Panama and Colombia: role of selectin versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*; Vol 9: 217-228.
- 59.** Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. (1990). Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*;265(28):17209-14.
- 60.** Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. (1989). The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*.; Vol 45(6):889-904.
- 61.** Kubota, T., Yamaura, Y., Ohkawa, N., Hara, H., Chiba, K. (2000). Frequencies of CYP2D6 mutation alleles in a normal Japanese population



and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. *Br J Clin Pharmacol*; Vol 50: 31-34.

62. Leathart, J.B., London, S.J., Steward, A., Adams, J.D., Idle, J.R., Daly, A.K. (1998). CYP2D6 phenotype-genotype relationships in african-americans and caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*; Vol 8: 529-541.

63. Lisker R, Perez-Briseño R, Granados J, et al. (1986). Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol*; Vol 71:203-207.

64. LLerena A, Edman G, Cobaleda J, Benitez J, Schalling D, Bertilsson L. (1993a). Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P-4502D6. *Acta Psychiatr Scand*.; Vol 87:23-8.

65. LLerena A, Herraiz AG, Cobaleda J, Johansson I, Da.Hi, ML. (1993b). Debrisoquine and mephenytoin hydroxylation phenotypes and CYP2D6 genotype in patients treated with neuroleptic and antidepressant agents. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*;54(6):606-11.

66. LLerena A, Calzadilla L, González I, Pérez B, Dorado P, Martínez M, Ordaz EB. (2001). CYP2D6 and CYP2C9 genetic polymorphism in a Cuban Population. *Pharmacol Toxicol*.;89:130.

- 67.** Llerena, A., Dorado, P., Peñas Lledó, E.M., Cáceres M.C., De la Rubia, A. (2006). Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients. *Pharmacogenomics J.*
- 68.** Llerena, A., Dorado, P., & Peñas Lledó, E. (2009). Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Future Medicine Vol 10* , 1-12.
- 69.** London SJ, Daly AK, Leathart JB et al. (1997). Genetic polymorphism CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians Los Angeles County. *Carcinogenesis Vol.18*, 1203–1214.
- 70.** López, M., Guerrero, J., Jung-Cook, H., & Alonso, M. (2005). CYP2D6 genotype and phenotype determination in a mexican meztizo population. *Eur J Clin Pharmacol Vol 61* , 749-754.
- 71.** Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. (199). Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene; Vol 226*:327-38.
- 72.** Luo, H.R., Gaedigk, A., Aloumanis, V., Wan, Y.J. (2005). Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in mexican americans. *Eur J. Clin Pharmacol; Vol 61*: 797-802.

- 73.** Ma, M.K., Woo, M.H. & McLeod, H.L. (2002). Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* Vol 59, Num. 206, 1-2069.
- 74.** Marandi, T., Dahl, M.L., Rago, L., Kiivet, R., Sjoqvist, F. (1997). Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation polymorphisms in a Russian population living in Estonia. *Eur J Clin Pharmacol*; Vol 53: 257-260.
- 75.** Marez D, Legrand M, Sabbagh M, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. (1997). Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*; Vol 7:193-202.
- 76.** Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J, Ingelman-Sundberg M.(1996). A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol*; Vol 42(6):713-9
- 77.** McCann, S., Pond, S., James, K., & Le Couteur, D. (1997). The association between polymorphisms in the cytochrome P450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case control study . *J. Neurol. Sci.* Vo153 , 50-53.
- 78.** McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J et al. (1997). Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* Vol 7, 187-191.

- 79.** McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE, Henner WD. (1995). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; Vol ,589-594.
- 80.** Mendoza, R., Wan, Y.J., Poland, R.E., Smith, M., Zheng, Y., Berman, N., Lin, K.M. (2001). CYP2D6 polymorphism in a mexican american population. *Clin Pharmacol Ther* ; Vol 70 : 552-560.
- 81.** Molden E, Johansen PW, Boe GH, Bergan S, Christensen H, Rugstad HE, Rootwelt H, Reubsaet L, Lehne G. (2002). Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites in relation to CYP2D6 genotype. *Clin Pharmacol Ther*; Vol 72(3):333-42.
- 82.** Murphy GM Jr, Pollock BG, Kirshner MA, Pascoe N, Cheuk W, Mulsant BH, Reynolds CF. (2001). CYP2D6 genotyping with oligonucleotide microarrays and nortriptyline concentrations in geriatric depression. *Neuropsychopharmacology*; Vol 25:737-43.
- 83.** Müller, B., Zöpf, K., Bachofer, J. and Steimer, W. (2003). Optimized strategy for rapid cytochrome P4502D6 genotyping by Real-Time Long PCR. *Clinical Chemistry*. Vol. 49, Num. 10, 1624 – 1631.
- 84.** Muñoz, S., Vollrath, V., Vallejos, M.P., Miquel, J.F., Covarrubias, C., Raddatz, A., Chianale, A. (1998). Genetic polymorphisms of CYP2D6,

CYP1A1 and CYP2E1 in South Amerindian population of Chile.  
*Pharmacogenetics* ; Vol 8 :343-351.

- 85.** Nakamura, K., Goto, F., Ray, W.A., McAllister, C.B., Jacqz, E., Wilkinson, G.R., et-al. (1985). Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between japanese and caucasian population. *Clin Pharmacol Ther*; Vol 38 : 402-408.
- 86.** Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, J.C., Johnson, E.F., Kemper, B. Levin W, Philips, J.R., Sato, R. & Waterman, M.R. (1987) The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* Vol. 6, 1-11.
- 87.** Oscarson M, Hidestrand M, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. (1997) A combination of mutations in the CYP2D6\*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol. Pharmacol*; Vol 52:1034–1040.
- 88.** Ostrosky, P. (2006). CYP2D6 gene and its relevance in drug metabolism. *Gaceta Biomédicas* , 1-3.
- 89.** Panserat, S., Sica, L., Gerard, N., Mathieu, H., Jacqz-Aigrain, E. (1999). CYP2D6 polymorphism in Gabonese population: contribution of the CYP2D6\*2 AND CYP2D6\*17 alleles to the high prevalence of the intermediate metabolic phenotype. *Br J Clin Pharmacol*; Vol 47: 121-124.

90. Porta , M. (2003). The genome sequence is a jazz score. *Int J. Epidemiol*  
*Vol 32*, 29-31.
91. Pedersen, R.S., Damkier, P., Brosen, K., (2005). Tramadol as a new probe  
for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol*  
*Ther*; *Vol 77*: 458-467.
92. Peñas LLedó C. Análisis del impacto potencial de las Biotecnologías en los  
problemas de Salud de los países en desarrollo. Trabajo de Grado.  
Universidad Complutense de Madrid; 2006.
93. Raimundo, S., Toscano, C., & Klein, K. (2004). A novel intrinsic mutation,  
2988G>A, with highpredictivity for impaired function of Cytochrome P450 D6  
in white subjects. *Clian Pharmacol* *Vol. 76* , 128-138.
94. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. (1999). Pharmacology. Churchill Livingstone  
Eds.;78-92.
95. Risch, N. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium.  
*Nature* , 847-856.
96. Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso  
N, Weiffenbach B. (1994). Identification of a new variant CYP2D6 allele with  
a single base deletion in exon 3 and its association with the poor  
metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*; *Vol 3(6)*:923-6.

- 97.** Scordo, M.G. & Spina, E. (2002) Cytochrome P-450 polymorphisms and response to antipsychotic therapy. *Pharmacogenomics* Vol. 3, 201-218.
- 98.** Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. (2004). Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res; Vol 50(2):195-200.*
- 99.** Sachse, C., Brockmüller, J., Bauer, S., & Roots, I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. . *Am. J. Hum. Genet* Vol. 60 , 284-295.
- 100.** Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. (2003). CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum. Mutat; Vol 22:476-485.*
- 101.** Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P450enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japonese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 270, Num 4, 14-423.
- 102.** Sosa Macías, M., Elizondo, G., Flores-Pérez, J., Bradley-Alvarez, F., Alanis-Banuelos, R.E., Lares-Asseff, I. (2006). CYP2D6 and phenotype in

amerindians of Tepehuano origin and mestizos of Durango Mexico. J Clin Pharmacol; Vol 46: 527-536.

103. Spavieri, M., & Rotenberg, R. (2004). Medicina Genómica: Aplicaciones del Polimorfismo de un nucleótido y micromatrices de ADN. Medicina (Buenos Aires) Vol. 64 , 533-542.
104. Steen, V., Andreassen, O., Daly, A., Tefre, T., Borresen, A., Idle, J., y otros. (1995). Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6 (D) gene deletion allele by long PCR technology . Pharmacogenetics Vol. 5 , 215-223.
105. Soucek P y Gut I. (1992). Cytochrome P-450 in rats: Structures, functions, properties and relevant human forms. Xenobiotica; Vol 22 Num 1, 83-103.
106. Smith, D.A., Abel, S.M., Hyland, R. & Jones, B.C. (1998) Human cytochrome P-450s: selectivity and measurement in vivo. Xenobiotica **12**, 1095-1128.
107. Smith, D.A., Ackland, M. & Jones, B.C. (1997) Properties of cytochrome P-450 isoenzymes and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P-450 substrates. Drug Discov Today **2**, 479-486.



108. Torrades, S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. OFFARM Vol. 21 , 122-125.
109. Tusié Luna, M. (2001). El Mapa de la variabilidad genética del humano los Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) y alguna de sus aplicaciones en medicina. Revista de investigación clínica Vol. 53, Num. 4 , 308 - 310.
110. Van der Weide, J., & Hinrichs, J. (2006). The influence of Cytochrome P450 pharmacogenetics on dosposition of common antidepressant and antipsychotic medications. Clin Biochem Vol. 27 , 17-22.
111. Venter, J., Adams, M., & Myers, E. (2001). The sequence of the human genome. Science Vol. 291 , 1304-1351.
112. Wan Yu-J.Y., Poland, R.E., Han, G., Konishi, T., Zheng, Y.P., Berman, N., et-al. (2001). Analysis of the CYP2D6 gene polymorphism and enzyme activity in Africans-Americans in Southern California. Pharmacogenetics; Vol 11: 489-499.
113. Wang S.L., Huang J.D., Lai M.D., Liu B.H. (1993). Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequency OF CYP2D6. Clin Pharmacol Ther. Vol 53, 410-418.

114. Wennerholm, A., Johansson, I., Massele, A.Y., Lande, M., Alm, C., Aden-Abdi, Y., Dahl, M.L., Bertilsson, L. (1999). Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics*; Vol 9: 707-714.
115. Wrighton SA, Stevens JC. (1992). The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. Crit Rev Toxicol; Vol 22:1-21.  
[www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm](http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm)
116. Zanger U, Turpeinen M, Klein K y Schwab M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotrasformation. Anal Bioanal Chem. Vol 392(6),1093-1108.
117. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; Vol 369(1):23-37.