



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION MOLECULAR DEL ALELO  
CYP2D6 \* 10  
Y DUPLICACIONES DEL GEN CYP2D6 EN  
POBLACION MEXICANA.

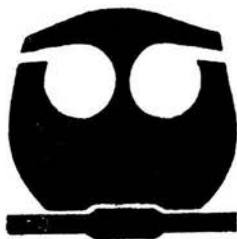
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MERCEDES IMELDA DAVALOS SALAS



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asigando:

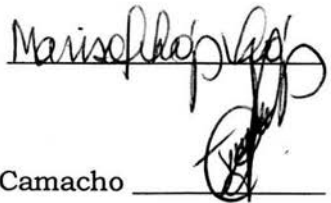
Presidente	Profa. Helgi Helen Jung Cook
Vocal	Profa. Marisol López López
Secretario	Profa. Leda Carolina Torres Maldonado
1 <sup>er</sup> . Suplente	Prof. José Manuel Morales Hernández
2 <sup>o</sup> . Suplente	Prof. Luis Jesús García Aguirre

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Proyecto No. 37103-M).

Asesor Dra. Marisol López López



Supervisor técnico QFB Jorge Luis Guerrero Camacho

Sustentante Mercedes Imelda Dávalos Salas



Por que todo lo que tengo es por ti  
Por tu ejemplo de dedicación y entereza  
Por tu fortaleza para sacar adelante una familia  
Porque eres mi ejemplo a seguir  
Porque con tu vida alimentas mi alma  
Gracias mamá.

Gracias a mis hermanos porque la interacción con ellos  
ha contribuido grandemente a ser quien soy

"soap", zapato, *tell me more...*  
Ich liebe dich

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ALELO *CYP2D6\*10* Y DUPLICACIONES DEL GEN *CYP2D6* EN POBLACIÓN MEXICANA.

**CONTENIDO.**

	Página
Lista de abreviaturas	5
Índice de tablas y figuras.	6
I. Resumen.	7
II. Introducción.	9
II.1. Metabolismo de fármacos.	9
II.1.1. Citocromos P450.	11
II.1.2. Nomenclatura de los citocromos P450.	15
II.2. Descubrimiento del polimorfismo de <i>CYP2D6</i> .	15
II.2.1. Diferencias interétnicas.	17
II.2.2. Genética molecular de <i>CYP2D6</i> .	19
II.2.3. Inhibición e inducción de <i>CYP2D6</i> .	24
II.2.4. Importancia clínica del fenotipo <i>CYP2D6</i> .	27
II.3. De la Farmacogenética a la Farmacogenómica.	29
II.4. Genética molecular en el laboratorio clínico.	33
II.4.1. Genotipificación	33
III. Justificación.	35
IV. Objetivos.	35
V. Hipótesis.	35
VI. Material y métodos.	36
VI.1. Material y equipo	36
VI.2. Metodología	37
VI.2.1. Obtención del material genético	37
VI.2.2. Cuantificación del DNA	38
VI.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	39
VI.2.4. Electroforesis en gel de acrilamida	39
VI.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa	40
VI.2.6. Amplificación de la región de interés de <i>CYP2D6*10</i>	40
VI.2.6.1. Resultados posibles de los genotipos para el alelo <i>CYP2D6*10</i>	41

VI.2.7. Amplificación de la región de interés para <i>CYP2D6*</i> X (MXN)	42
VI.2.7.1. Resultados posibles de la investigación de las duplicaciones del gen <i>CYP2D6</i>	43
VII. Resultados.	44
VII.1. Identificación del alelo <i>CYP2D6*10</i>	44
VII.2. Identificación de duplicaciones del gen <i>CYP2D6</i>	45
VIII. Discusión.	47
IX. Conclusiones.	53
X. Bibliografía.	54
XI. Glosario.	63

## Lista de abreviaturas

<i>CYP2D6</i>	Gen citocromo P450 2D6
<i>CYP2D6* MxN</i>	Alelo del gen citocromo P450 2D6 duplicado
<i>CYP2D6</i>	Enzima 4-hidroxilasa de debrisoquina, también conocida como citocromo P450 2D6
DME	Enzimas metabolizadoras de fármacos
PM	Metabolizador pobre o lento
IM	Metabolizador intermedio
EM	Metabolizador extenso o rápido
UM	Metabolizador ultra extenso o ultra rápido

## Índice de figuras y tablas

Figura 1 Principales DME de fase I y fase II	10
Figura 2. Representación esquemática de la enzima <i>CYP2D6</i>	11
Figura 3. Ciclo catalítico del citocromo P450	12
Figura 4 Nomenclatura del citocromo P450 2D6	15
Figura 5 Representación gráfica del cromosoma 22	20
Figura 6.- Representación gráfica de los haplotipos comunes del gen <i>CYP2D6</i>	22
Figura 7. Mecanismo postulado para la generación de alelos con genes <i>CYP2D6</i> duplicados.	23
Figura 8. Proporción de fármacos metabolizados por los principales citocromos P450.	28
Figura 9. Representación esquemática de los posibles resultados para el genotipo de <i>CYP2D6*10</i> .	42
Figura 10. Representación esquemática de los posibles resultados para el genotipo de <i>CYP2D6</i> con genes duplicados.	43
Figura 11. Imagen de un gel de acrilamida 8%.	44
Figura 12. Esquema representativo de las regiones amplificadas para detectar duplicaciones del gen <i>CYP2D6</i> .	45
Figura 13. Imagen de un gel de agarosa 2%.	45
Tabla 1. Principales familias y subfamilias del citocromo P450	14
Tabla 2. Frecuencia de metabolizadores pobres y duplicaciones del gen <i>CYP2D6</i> en diferentes poblaciones genotipificadas.	18
Tabla 3. Distribución del alelo <i>CYP2D6*10</i> en el ámbito mundial.	19
Tabla 4. Inhibidores de <i>CYP2D6</i>	25
Tabla 5. Función de algunas familias de CYP y agentes inductores	26
Tabla 6. Principales polimorfismos farmacogenéticos en las DME.	32
Tabla 7.- Frecuencia genotípica y alélica de <i>CYP2D6*10</i> en 106 muestras de individuos mexicanos	44
Tabla 8.-Frecuencia de duplicaciones del gen <i>CYP2D6</i> en 127 muestras de individuos mexicanos	46
Tabla 9 (tabla 3 modificada). Frecuencia del alelo <i>CYP2D6*10</i> en diferentes poblaciones.	49
Tabla 10 (tabla 2 modificada). Frecuencia de duplicaciones (MxN) del gen <i>CYP2D6</i> en diferentes poblaciones.	51



## I.- RESUMEN.

Los citocromos P450 son una superfamilia de proteínas que metabolizan compuestos endógenos, xenobióticos y fármacos. El funcionamiento óptimo de estas enzimas es muy importante para la depuración de los xenobióticos a los que diariamente está expuesto el organismo y para un tratamiento terapéutico eficaz.

La 4-hidroxilasa de debrisoquina (CYP2D6) es una isoenzima perteneciente a la superfamilia P450, codificada por el gen *CYP2D6* que se localiza en el cromosoma 22q13.1 asociado a dos pseudogenes, *CYP2D7P* y *CYP2D8P*. La nomenclatura indica la familia a la que pertenece (2), la subfamilia (D) y el orden en que fue identificada (6).

La enzima CYP2D6 metaboliza más de la cuarta parte de los fármacos que actualmente se prescriben en la práctica clínica, entre ellos antidepresivos tricíclicos, ciertos neurolépticos, antiarrítmicos, antihipertensivos, beta bloqueadores y derivados de morfina.

En la actualidad se han identificado más de 70 variantes alélicas, por lo que se considera a *CYP2D6* un gen altamente polimórfico. Estos polimorfismos genéticos son el resultado de mutaciones y dependiendo de los alelos que presenten los individuos, se pueden clasificar en tres fenotipos: metabolizadores pobres (PM), extensos (EM) y ultra rápidos (UM).

El alelo *CYP2D6\*10* se correlaciona con individuos PM y está reportado como la variante alélica más común en población oriental con una frecuencia de 51%. El metabolismo conocido como ultra rápido es causado por la presencia de genes *CYP2D6* duplicados, multiduplicados o amplificados, excepto cuando se trata de duplicación de alelos inactivos como los alelos *CYP2D6\*4* y *CYP2D6\*5*.

El objetivo de este trabajo fue identificar la frecuencia alélica de la principal mutación en el gen *CYP2D6* que origina al alelo *CYP2D6\*10* y la de las variantes alélicas que presentan duplicaciones en una muestra de individuos de población mexicana.

En todos los casos, la genotipificación se realizó con DNA genómico aislado de sangre periférica. La técnica empleada fue PCR-RFLP, para lo cual una región específica del gen de interés se amplificó por PCR y el producto amplificado se digirió

con endonucleasas de restricción específicas. Los productos obtenidos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa o acrilamida teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

Los resultados mostraron una frecuencia alélica de 11.32% para el caso del alelo *CYP2D6\*10* en 106 muestras analizadas, la cual es similar a la frecuencia del mismo alelo en los etíopes y la frecuencia para las duplicaciones del gen *CYP2D6* fue 13.38% exhibiendo similitud con la población española y árabe.

En el futuro este conocimiento de las variantes alélicas de *CYP2D6* en población mexicana permitirá personalizar el tratamiento terapéutico para obtener óptimos resultados, así como eliminar las reacciones adversas de los fármacos metabolizados por *CYP2D6*.

## II.- INTRODUCCIÓN.

### II.1.- Metabolismo de fármacos

Todos los organismos están expuestos de manera constante e inevitable a sustancias químicas tanto extrañas como naturales, entre ellas: fármacos, químicos industriales, plaguicidas, contaminantes, productos de pirólisis de alimentos cocinados, alcaloides, metabolitos secundarios de plantas y toxinas producidas por mohos, plantas y animales. Lamentablemente, la propiedad física que permite que muchos xenobióticos se absorban a través de la piel, los pulmones y el tubo digestivo, a saber, su lipofilicidad, es un obstáculo para su eliminación porque los compuestos lipófilos pueden reabsorberse con facilidad. En consecuencia, la eliminación de xenobióticos a menudo depende de la conversión en sustancias químicas hidrosolubles mediante un proceso conocido como metabolismo o biotransformación. Sin ésta, los xenobióticos lipófilos se excretarían con tanta lentitud, que a la postre intoxicarían a un organismo y lo matarían (*Klassen y Watkins, 1999*).

Un cambio de la conducta farmacocinética no es la única consecuencia de la biotransformación de xenobióticos. Los xenobióticos ejercen diversos efectos sobre los sistemas biológicos, que son independientes de las propiedades fisicoquímicas de éstos. En muchas circunstancias, la modificación química de un xenobiótico mediante biotransformación altera sus efectos biológicos. La importancia de este principio para la farmacología es que algunos fármacos deben sufrir biotransformación para ejercer sus efectos farmacodinámicos (*Klassen y Watkins, 1999*).

La biotransformación de xenobióticos es el principal mecanismo para conservar la homeostasia durante la exposición de los organismos a moléculas extrañas pequeñas como los fármacos. Para moléculas extrañas grandes, entre ellas microorganismos invasores como virus y bacterias, la homeostasia se logra mediante el sistema inmunitario (*Klassen y Watkins, 1999*).

En general, las reacciones catalizadas por las enzimas metabolizadoras de fármacos (DME, *Drug Metabolizing Enzymes*) responsables de la biotransformación se dividen en dos grupos, reacciones de fase I y reacciones de fase II (figura 1). Las

reacciones de fase I comprenden hidrólisis, reducción y oxidación. Estas reacciones exponen o inducen un grupo funcional (-OH, NH<sub>2</sub>, -SH o -COOH), y regularmente originan un incremento en la hidrofiliidad. Las reacciones de biotransformación de fase II incluyen glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación con aminoácidos como glicina, taurina y ácido glutámico. Casi todas las reacciones de biotransformación de fase II dan por resultado un aumento grande de la hidrofiliidad del xenobiótico; y por ende favorecen mucho la excreción de sustancias químicas extrañas (Nebert y Dieter, 2000).

Las enzimas metabolizadoras de fármacos están ampliamente distribuidas en todo el organismo y se encuentran en varios compartimientos subcelulares. Sin embargo, en vertebrados, el hígado es la fuente más rica de enzimas que catalizan reacciones de biotransformación. En la figura 1 se muestra la distribución hepática de las principales DME de fase I y fase II. Estas enzimas también se localizan en la piel, pulmones mucosa nasal, ojos, cerebro, tubo digestivo, riñones, suprarrenales, páncreas, bazo, corazón, testículos, ovarios, placenta, plasma, eritrocitos, plaquetas, linfocitos y aorta. Dentro del hígado y casi todos los otros órganos, las enzimas que catalizan reacciones de biotransformación se localizan en el retículo endoplásmico (RE) o en la fracción soluble del citoplasma (citósol); y en menor cantidad en las mitocondrias, núcleos y lisosomas (Bertilsson y cols, 1997; Marez y cols, 1997; Klassen y Watkins, 1999).

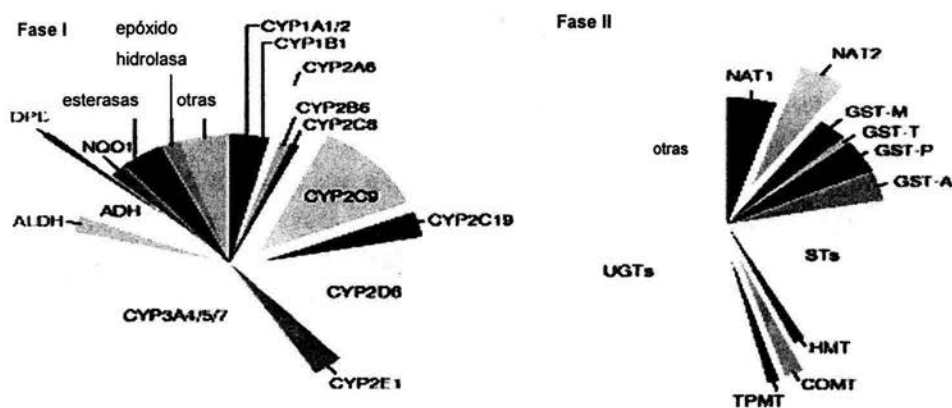
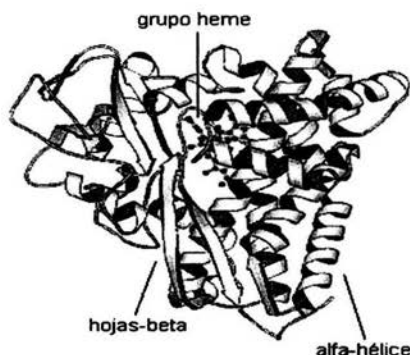


Figura 1 Principales DME de fase I y fase II (modificado de Evans y Relling 1999)

## II.1.1.- Citocromos P450

Entre las enzimas biotransformadoras de fase I, el sistema del citocromo P450



**Figura 2.** Representación esquemática de la enzima CYP2D6 (www.mogensgallardo.com)

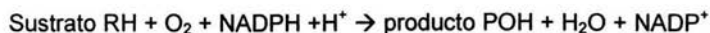
(figura 2) ocupa el primer lugar en lo que se refiere a versatilidad catalítica y al número absoluto de sustancias químicas que detoxifica o activa en intermediarios reactivos (Skoda y cols, 1988; Masimirembwa y cols, 1993).

Las enzimas P450 microsómicas hepáticas tienen una participación muy importante en la determinación de la intensidad de acción de fármacos y la duración de la misma, pero también intervienen en la detoxificación de

xenobióticos. Las enzimas P450 microsómicas y mitocondriales tienen participaciones clave en la biosíntesis o en el catabolismo de hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitaminas liposolubles, ácidos grasos y eicosanoides, lo que subraya la versatilidad catalítica del sistema citocromo P450 (Masimirembwa y cols, 1993; Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002).

Todas las enzimas P450 son proteínas que contienen el grupo heme. Por lo general, el hierro heme en el citocromo se encuentra en el estado férrico ( $Fe^{3+}$ ). Cuando se reduce al estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), el citocromo P450 puede unir ligandos como  $O_2$  y monóxido de carbono (CO). El complejo entre el citocromo P450 ferroso y el monóxido de carbono absorbe luz al máximo a una longitud de 450 nm. Al competir con el oxígeno, el monóxido de carbono inhibe al citocromo P450. El efecto inhibitor del monóxido de carbono puede revertirse mediante irradiación con luz a 450 nm, lo que fotodisocia el complejo del citocromo P450-monóxido de carbono (Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002).

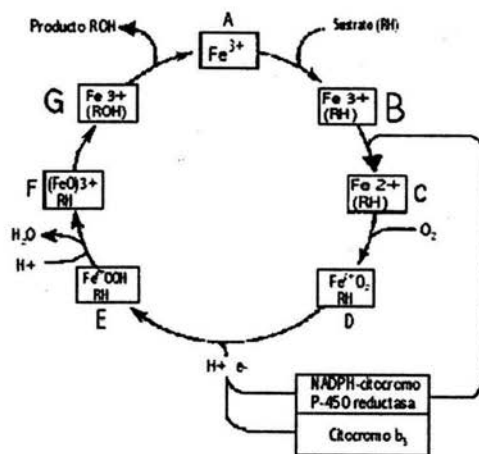
La reacción básica catalizada por el citocromo P450 es la monooxigenación, en la cual un átomo de oxígeno se incorpora en un sustrato, designado RH, y el otro se reduce hacia agua con equivalentes derivados del NADPH, como sigue:



Aunque el citocromo P450 funciona como una monooxigenasa, debido a reacciones de reordenamiento, los productos no se limitan a alcoholes y fenoles. Durante la catálisis, el citocromo P450 se une de manera directa al sustrato y al oxígeno molecular, pero no interactúa de modo directo con NADPH o NADH. El mecanismo por el cual el citocromo P450 recibe electrones desde el NAD(P)H depende de la localización subcelular de éste. El citocromo P450 y la NADPH-citocromo P450 reductasa están embebidos en la bicapa de fosfolípidos del retículo endoplásmico, lo que facilita su interacción (Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002).

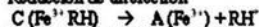
El citocromo  $b_5$  puede donar el segundo de dos electrones requeridos por el citocromo P450. Aunque se esperaría que esto simplemente aumentara la tasa de catálisis del citocromo P450, el citocromo  $b_5$  también puede aumentar la afinidad aparente con la cual ciertas enzimas P450 se unen a sus sustratos, es decir, puede incrementar la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) o disminuir la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de las reacciones citocromo P450 (Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002).

En la figura 3 se explica la primera parte del ciclo catalítico del citocromo P450, que comprende la activación de oxígeno, y la parte final, la oxidación de sustrato que supone la sustracción de un átomo de hidrógeno o de un electrón desde el sustrato, seguida por la restitución de la unión de oxígeno (recombinación radical). Después de la unión al sustrato de la enzima P450, el hierro heme se reduce desde el estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) hacia el ferroso

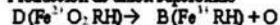


#### Otras reacciones

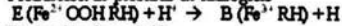
Reducción de un electrón



Producción de anión superóxido



Producción de peróxido de hidrógeno



Derivación de peróxido

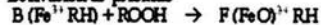


Figura 3. Ciclo catalítico del citocromo P450 (Klassen y Watkins, 1999).

( $\text{Fe}^{2+}$ ) mediante la transferencia de un electrón único proveniente de la NADPH-citocromo P450 reductasa. La reducción del citocromo P450 se facilita mediante unión al sustrato quizá porque esta unión en la vecindad de la porción del heme convierte al hierro desde un estado de espín bajo hacia uno alto. El oxígeno se une al citocromo P450 en su estado ferroso, y el complejo de  $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2$  se convierte en un complejo  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$  mediante transferencia de un protón ( $\text{H}^+$ ) y un segundo electrón, que se deriva de la NADPH-citocromo P450 reductasa o del citocromo  $b_5$ . La introducción de un segundo protón desdobra el complejo  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$  para producir agua y un complejo de  $(\text{FeO})^{3+}$ , que transfiere su átomo de oxígeno al sustrato. La liberación del sustrato oxidado regresa a su estado inicial al citocromo P450. Si el ciclo catalítico se interrumpe (desacopla) después de que se introduce al primer electrón, el oxígeno se libera como anión superóxido ( $\text{O}^-$ ). Si el ciclo se interrumpe después de la introducción del segundo electrón, el oxígeno se libera como peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las especies oxidantes finales  $(\text{FeO})^{3+}$  pueden generarse de manera directa sobre la transferencia de un átomo de oxígeno desde el peróxido y ciertos otros superóxidos, un proceso conocido como la derivación peróxido. Por esta razón, ciertas reacciones citocromo P450 pueden apoyarse por hidroperóxidos en ausencia de NADPH-citocromo P450-reductasa y NADPH (Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002).

La superfamilia P450 está compuesta de familias y subfamilias de enzimas que son definidas solamente con base a similitudes en su secuencia de aminoácidos. Con pocas excepciones, la secuencia de una proteína P450 de una familia exhibe hasta 40% de semejanza con un P450 de otra familia. Los P450 con una sola subfamilia siempre comparten más de 55% de similitud en su secuencia (Abraham y Adithan, 2001).

Se han descrito treinta familias de citocromos P450, diez en mamíferos, una en insectos, dos en caracoles, una en plantas y dos en bacterias (González, 1992). Las familias identificadas en mamíferos se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Principales familias y subfamilias del citocromo P450 en mamíferos

Citocromo.	No. de subfamilias	No. de Isoformas	Reacciones.
CYP1	1	2	Metabolismo de xenobióticos
CYP2	8	57	Metabolismo de xenobióticos y esteroides
CYP3	2	10	Metabolismo de xenobióticos y esteroides
CYP4	2	10	Hidroxilación $\omega$ y $\omega$ -1 de ácidos grasos
CYP7	1	1	Hidroxilación $7\alpha$ en el colesterol
CYP11	2	3	Hidroxilación $11\beta$ en esteroides
CYP17	1	1	Hidroxilación $17\alpha$ en esteroides
CYP19	1	1	Aromatasa
CYP21	1	1	Hidroxilación en C-21 en esteroides
CYP27	1	1	Hidroxilación en C-27 en esteroides

(Tomado de González, 1992)



## II.1.2.- Nomenclatura de los citocromos P450

Los genes que codifican para la superfamilia de enzimas P450 (EC. 1.14.14.1) (Park, 2000) son designados como CYP, la cual está integrada a su vez por familias y subfamilias, designadas con números ordinales o arábigos y letras, respectivamente. La isoforma de la enzima se distingue con un número cardinal colocado en último lugar, como se ve en la figura 4. (González, 1992; Linder y cols, 1997).

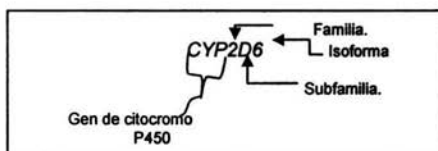


Figura 4 Nomenclatura del citocromo P450 2D6 (González 1992, Linder y cols 1997)

Para nombrar los alelos se utilizan números arábigos o una combinación de números arábigos seguidos por una letra mayúscula. Se recomienda separarlo del gen con un asterisco (ej. *CYP2D6\*1B*). Las copias extra de un alelo (duplicados o amplificados) pueden existir en tándem, por ejemplo el alelo *CYP2D6\*2X2* contiene dos copias del alelo *CYP2D6\*2*. Cuando la duplicación no es del mismo subgrupo, éstos son separados con una coma (ejemplo *CYP2D6\*10B,10C*) (Daly y cols, 1996; Garte y Crosti, 1999)

## II.2.- Descubrimiento del polimorfismo de *CYP2D6*

El término polimorfismo genético se refiere a rasgos mendelianos o monogénicos que existen en la población en al menos dos fenotipos, ninguno de los cuales es raro. (Skoda y cols, 1988)

Entre 1977 y 1979 dos grupos independientes descubrieron la deficiencia del metabolismo de debrisoquina y esparteína, respectivamente. Este descubrimiento no resultó de una estrategia planeada, sino de una observación accidental: un evento dramático en un estudio farmacocinético instó la búsqueda del defecto metabólico

específico. En Inglaterra unos investigadores estaban participando en un estudio de debrisoquina, un fármaco simpaticolítico y observaron que algunos de los pacientes tuvieron una respuesta hipotensiva mucho más pronunciada que otros con una dosis subterapéutica. En otro estudio realizado por Eichelbaum y colaboradores (1979), donde se investigó el curso cinético de una preparación de liberación lenta o sostenida de esparteína, dos sujetos presentaron efectos adversos como diplopia, visión nublada, desvanecimiento y dolor de cabeza. El análisis de los niveles plasmáticos de esparteína en comparación con los demás sujetos, resultaron en tres o cuatro veces más altos. Posteriormente se determinó que esto ocurrió debido a la actividad deficiente de una enzima que se denominó 4-hidroxilasa de debrisoquina/esparteína (CYP2D6) (Mahgoub y cols, 1977).

Los intervalos de actividad de CYP2D6 van desde deficiencia completa hasta metabolismo ultrarrápido (Sachse y cols, 1997). El índice de la actividad de hidroxilasa dependiente de CYP2D6 puede ser estudiado *in vivo* por la medición del radio entre la recuperación urinaria de debrisoquina y el metabolito 4-hidroxidebrisoquina después de una dosis simple de debrisoquina. Este radio metabólico (MR, *Metabolic Ratio*) varía en la población desde  $\approx 0.01$  a  $>100$  (McElroy y cols, 2000; Ingelman-Sundberg y Evans y Johnson, 2001; Lovlie y cols, 2001). El polimorfismo de CYP2D6 es expresado en cuatro principales fenotipos, comúnmente llamados metabolizadores pobres (PM *Poor Metabolizer*), metabolizadores intermedios (IM *Intermediate Metabolizer*), metabolizadores extensos (EM *Extensive Metabolizer*) y metabolizadores ultrarrápidos (UM *Ultrarapid Metabolizer*) (Marez y cols, 1997). El fenotipo PM es clasificado como sujetos con radio metabólico (MR *Metabolic Ratio*)  $MR_{\text{debrisoquina}} > 12.6$ ,  $MR_{\text{esparteína}} > 20$  o  $MR_{\text{dextrometorfán}} > 0.3$ , mientras que el fenotipo UM es definido como sujetos con  $MR_{\text{debrisoquina}} < 0.20$ ,  $MR_{\text{esparteína}} < 0.15$ . El fenotipo EM corresponde a los valores de MR entre estos dos extremos (McElroy y cols, 2000; Ingelman-Sundberg y Evans y Johnson, 2001; Lovlie y cols, 2001).

Los individuos PM son homocigotos para genes CYP2D6 deficientes, por lo que metabolizan algunos sustratos de CYP2D6 con índice reducido. En algunos casos, los tratamientos con dosis estándar pueden causar niveles plasmáticos muy altos en estos individuos, con un riesgo incrementado de efectos adversos y toxicidad del fármaco que pueden amenazar la vida. En otros casos, la ausencia de la enzima CYP2D6 puede

resultar en el efecto farmacoterapéutico nulo, si el fármaco en cuestión requiere activación metabólica por la enzima (Brosen y cols, 1994; Kroemer y Eichelbaum, 1995; Linder y cols, 1997).

Otro tipo de metabolismo es el conocido como metabolismo ultra rápido (UM) y es causado por la presencia de genes *CYP2D6* duplicados, multiduplicados o amplificados. Actualmente, han sido reportados alelos en tándem con dos, tres, cuatro, cinco y trece copias del gen (Johansson y cols, 1993). El número de individuos que portan múltiples copias del gen *CYP2D6* es alto en Etiopía y Arabia Saudita, donde hasta un tercio de la población exhibe este fenotipo (Ingelman-Sundberg y cols, 1999).

La amplificación génica fue primeramente descrita en 1978 como un mecanismo de resistencia adquirida en células de mamífero cultivadas. Desde entonces, muchos ejemplos de amplificación de genes han sido relacionados a la biología del cáncer, en particular a la amplificación de oncogenes. La amplificación de genes es usualmente responsable de una alta frecuencia de resistencia a ciertos fármacos comúnmente observados *in vitro* en una selección de líneas de células de mamíferos. Aparentemente la herencia de amplificación de un gen fue descrita por primera vez por Prody y colaboradores en 1989, al mostrar que las partes de un gen "silencioso" de colina esterasa fueron amplificadas en un granjero y su hijo, quienes pertenecían a una familia expuesta a insecticidas organofosforados por varias generaciones. El evento inicial de amplificación probablemente ocurrió y fue seleccionado durante la espermatogénesis u ovogénesis para después ser heredado (Johansson y cols, 1993).

### II.2.1.- Diferencias interétnicas

Los estudios raciales y étnicos del metabolismo de fármacos han mostrado diferencias sustanciales entre poblaciones respecto a la distribución polimórfica de la actividad de *CYP2D6* y los correspondientes genomas (Yue y cols, 1989; Lou, 1990).

Las variantes alélicas *CYP2D6* más comunes en las poblaciones caucásica (Wolf y Smith, 1999a), china/japonesa (Tateishi y cols, 1999) y negra africana/afro-americana (Ingelman-Sundberg y cols, 1999) son *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*10* y *CYP2D6\*17*,

respectivamente.

También los metabolizadores ultra extensos o ultra rápidos, son reportados con una prevalencia que varía de 1.5 a 29% en diferentes grupos étnicos (Abraham y Adithan, 2001). La frecuencia de las duplicaciones del gen *CYP2D6* fue de 2 hasta 7% entre las principales poblaciones europeas (Johansson y cols, 1993; Steijns y Van Der Weide, 1998) y una proporción de 12% en sujetos turcos. Los portadores de duplicaciones del gen en Arabia Saudita (McLellan y cols, 1997) y Etiopía (Aklillu y cols, 1996) son 21 y 29%, respectivamente. La prevalencia de PM y UM en diferentes grupos étnicos se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Frecuencia de metabolizadores pobres y duplicaciones del gen *CYP2D6* en diferentes poblaciones genotipificadas.

Población	Muestra (n)	PM (%)	MxN (%)
Norteamericana blanca	464	5.8	2.2
Norteamericana negra	246	3.3	2.4
Alemana	589	7.0	2.0
Alemana del sur	195	7.7	1.5
Española	258	5.0	1.0*
Española del norte	147	5.4	5.1
Española del sur	217	2.8	3.5
Suiza	270	8.0	1.0
Francesa	265	8.4	1.9
Turca	404	1.5	5.8
Coreana	152	0	0.3
China	113	0	1.3
Nicaragüense	137	3.6	1.1
Etíopes	122	1.8	29
Árabe Saudita	101	2.0	21
Tanzana	NR	NR	7
Mediterránea	NR	NR	10

(Tomada de Abraham y Adithan, 2001). NR = no reportado \*7% Agúndez y cols, 1995

En el *locus* de *CYP2D6* de la población china se han identificado dos variantes del gen *CYP2D6* llamadas *CYP2D6\*10B* y *CYP2D6\*10C* actualmente llamado *CYP2D6\*36* (Ingelman-Sundberg y cols, 1992; Johansson y cols, 1994; Chida y cols, 2002). El alelo *CYP2D6\*10B* contiene tres de las siete mutaciones mostradas en el alelo *CYP2D6\*4A* y una mutación silenciosa adicional (Johansson y cols, 1994). La mutación crucial en el alelo *CYP2D6\*10* es el intercambio C<sup>188</sup>→T en el exón 1, el cual causa una sustitución de aminoácido Pro<sup>34</sup>→Ser y la formación de una enzima inestable (Johansson y cols, 1994). El fenotipo de metabolizador pobre incluye al alelo *CYP2D6\*10* cuya distribución mundial se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Distribución del alelo *CYP2D6\*10* en el ámbito mundial.

Población	Muestra (n)	Frecuencia (%)
Caucásica	589	1.52
Malaya	30	43.3
Etiope	115	8.6
China(en Suiza)	113	50.7
China (en Taiwán)	124	70*
China (en Singapur)	93	62*
Coreana	152	51
Japonesa	162	31.8-38.6

(Tomada de Roh y cols, 1996 con modificaciones (Johansson y cols, 1994; Abraham y Adithan, 2001; Gan y cols, 2002) \*Probablemente sobreestimada por el método de análisis utilizado

## II.2.2.- Genética molecular de *CYP2D6*.

El gen *CYP2D6* reside en la región cromosómica *CYP2D6-8* localizada en 22q 13.1 (figura 5) en asociación con los pseudogenes *CYP2D7P* y *CYP2D8P* (Kimura y cols, 1989).

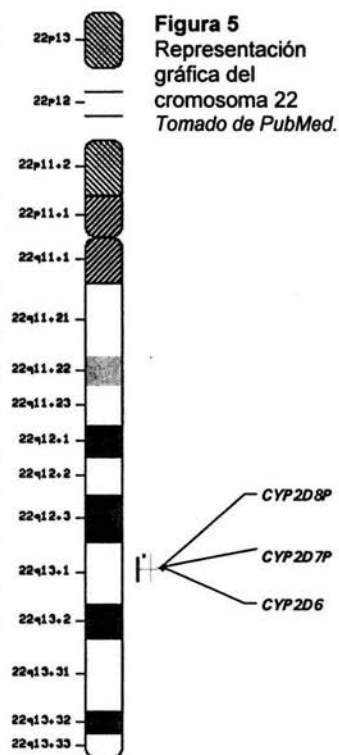
El número de alelos mutantes de *CYP2D6* conocidos está creciendo; y a la fecha

se han descrito alrededor de 79 diferentes alelos *CYP2D6* deficientes (McCarthy y cols, 2002; Weinshilboum, 2003; <http://www.imm.ki.se/cypalleles/>).

Los alelos defectuosos de *CYP2D6* pueden ser el resultado de la delección del gen (Gaedigk y cols, 1991), conversiones del gen con los pseudogenes relacionados o mutaciones de nucleótido simple también conocidas como SNP (por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) (Kagimoto y cols, 1990) que causan cambio en el marco de lectura, mutaciones sin sentido, de sentido equivocado o de sitio de empalme (Ingelman-Sundberg y cols, 1999; Meyer y cols, 1990). La presencia de tales alelos en forma homocigota conduce a una ausencia total de actividad enzimática y habilidad deficiente para metabolizar fármacos específicos de prueba para la enzima metabolizadora de fármacos. Estos sujetos son clasificados como PM (Ingelman-Sundberg y cols, 1999; Kagimoto y cols, 1990; Meyer y cols, 1990; Gaedigk y cols, 1991; Gonzalez y Meyer, 1991)

Por otro lado, la administración de sustratos para *CYP2D6* a individuos UM puede resultar en un fracaso terapéutico porque las concentraciones plasmáticas del fármaco activo en dosis estándar serán demasiado bajas debido a la ultra rápida conversión metabólica (Lovlie y cols, 1996; Dalen y cols, 1998). La presentación clínica de los pacientes PM y UM es a veces similar, llevando a la confusión en el entendimiento de las bases de las reacciones adversas a fármacos (Wolf y cols, 2000).

Los tres fragmentos *Xba*I más frecuentes en el sitio *CYP2D* son 29, 44 y 13 kb (11.5 kb), respectivamente. El alelo común de 29 kb contiene el gen *CYP2D6* (tipo silvestre o mutante) y los dos pseudogenes *CYP2D8* y *CYP2D7* (Nebert y Menon, 2001). El alelo de 44 kb está asociado usualmente con la mutación *CYP2D6\*4* y comprende el gen *CYP2D6* y tres pseudogenes *CYP2D8*, *CYP2D7AP* y *CYP2D7BP* (Roden y George, 2002). El alelo de 13 kb *CYP2D6\*5* es generado por la delección completa del gen *CYP2D6*, y contiene sólo los pseudogenes *CYP2D8* y

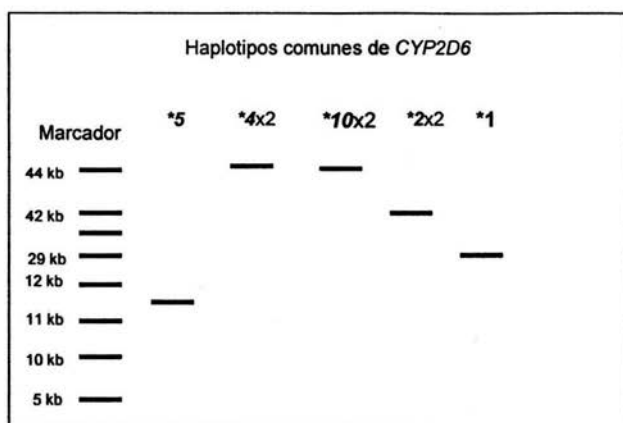


*CYP2D7* (Steijns y Van Der Weide, 1998; Schur y cols, 2001). Los genes *CYP2D6* duplicados son usualmente funcionales y el fragmento *Xba*I de 42 kb ha sido asociado con el fenotipo UM (Løvlie y cols, 1996) Figura 6.

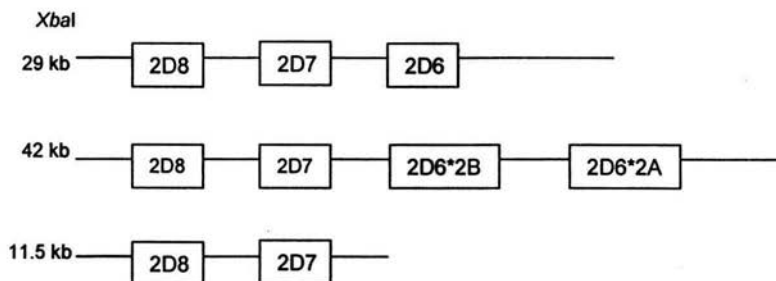
Løvlie y colaboradores demostraron recientemente la presencia de dos repetidos directos grandes CYP-REP flanqueando el locus *CYP2D6* (Løvlie y cols, 1996; Allorge y cols, 2001; Schur y cols, 2001). Los puntos de corte de la delección del gen del alelo *CYP2D6\* 5* están presentes dentro de las regiones CYP-REP de 2.8 kb, indicando que la delección ha ocurrido por homología, desigual recombinación (Schur y cols, 2001). También se ha propuesto que los alelos con duplicación *CYP2D6* pueden ser explicados como un evento de delección recíproco, involucrando las mismas unidades CYP-REP (Lundqvist y cols, 1999) Figura 7.

La genotipificación/fenotipificación de *CYP2D6* conducirá a incrementar la eficacia terapéutica, mejorar la respuesta del paciente, así como la relación costo-efecto respecto a la medicación de los fármacos metabolizados por esta enzima (Linder y cols, 1997; Chen y cols, 1996).

A



B



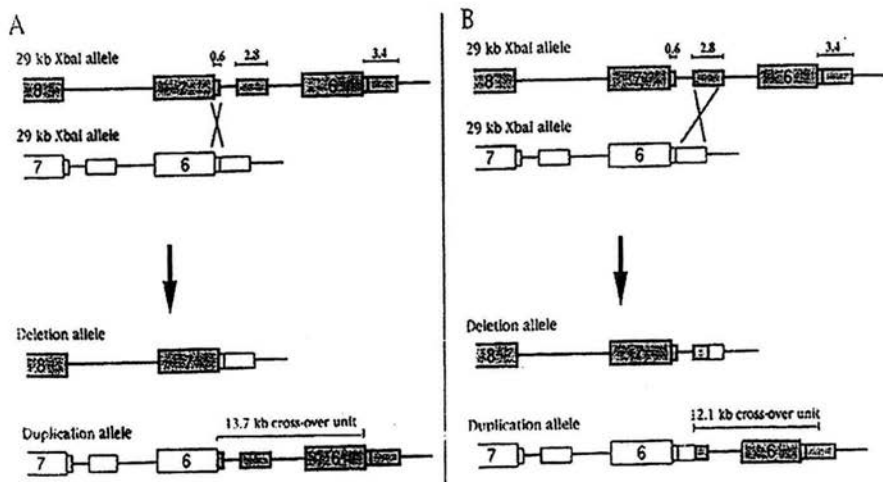
**Figura 6.-** Representación gráfica de los haplotipos comunes del gen *CYP2D6*

(A) Análisis de RFLP del locus *CYP2D6* de DNA genómico con genotipos *Xba*I definidos. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, DNA de un individuo con genotipo *Xba*I 11.5 kb que representa la delección del gen *CYP2D6* en el alelo *CYP2D6*\*5. Carril 3 y 4, DNA de individuos con genotipo *Xba*I 44 kb que representan la duplicación del alelo *CYP2D6*\*4 relacionado con PM en caucásicos y la duplicación del alelo *CYP2D6*\*10 relacionado con EM en orientales. Carril 5, DNA de un individuo con genotipo *Xba*I 42 kb que representa la duplicación del alelo funcional *CYP2D6*\*2. Carril 6, DNA de un individuo con genotipo *Xba*I 29 kb correspondiente al alelo silvestre o *CYP2D6*\*1.

(B) Representación esquemática del locus *CYP2D6* para individuos con los haplotipos *Xba*I 29, 42 y 11.5 kb.

(Tomado de Lundqvist y cols, 1999 con modificaciones.)





**Figura 7.** Mecanismo postulado para la generación de alelos con genes *CYP2D6* duplicados. Los paneles muestran recombinación desigual entre cualquiera de las regiones repetidas de 0.6kb (A) o 2.8 kb (B) que flanquean el gen *CYP2D6* (Tomado de *Løvlie y cols, 1996*)

La fenotipificación con fármacos de prueba puede ser utilizada para identificar a los sujetos PM y UM. Sin embargo, el procedimiento es tardado y caro, y la determinación de fenotipo puede ser confundida por el uso concomitante de otros medicamentos los cuales afectan la actividad de CYP2D6 (*Abraham y Adithan, 2001*).

Aunque no se tienen criterios claros de la evaluación estructural de cómo un compuesto es metabolizado por la enzima CYP2D6, se ha observado que la mayoría de los sustratos e inhibidores metabolizados por CYP2D6 tienen un nitrógeno básico y son oxidados en el sitio dentro de 0.5-0.7 nm de este átomo (*Kroemer y Eichelbaum, 1995*). También pueden tener una región lipofílica y grupos funcionales los cuales tengan capacidad para interacciones electrostáticas o la habilidad de formar puentes de hidrógeno (*Smith y cols, 1992; May, 1994*). La enzima incluso puede mostrar estereoselectividad. En los metabolizadores extensos, el R-metoprolol inactivo es metabolizado más rápido que el S-enantiómero mientras que este metabolismo no es estereoselectivo en metabolizadores pobres (*Lennard y cols, 1983*).

### **II.2.3.- Inhibición e inducción de CYP2D6**

La quinidina es el inhibidor más potente ( $k_i=0.03$ ) de CYP2D6 (*Smith y cols, 1992*). La quinina, diastereoisómero de la quinidina, es un inhibidor menos de 100 veces potente que la quinidina. Aunque la quinidina no es sustrato de CYP2D6 (*Lennard, 1990*), una dosis oral de 200 mg de sulfato de quinidina es adecuado para convertir a los metabolizadores extensos en metabolizadores pobres (*Muralidharan y cols, 1991*). En la tabla 4 se muestra una lista de inhibidores de CYP2D6.

**Tabla 4.** Inhibidores de CYP2D6

Amitriptilina	Aprindina	Amesergida
Bufuralol	Cloroquina	Budipina
Cimetidina	Cistiothixene	Clorpromazina
Citalopram	Clozepina	Clomipramina
Difenilhidramina	Flecainida	Desmetilimipramina
Fluoxetina	Flufenacina	Fluoxamina
Halofantrina	Levomepromazina	Haloperidol
Meclobemida	Olanzapina	Metadona
Paroxetina	Perazina	Oxprenolol
Perfenazina	Propranolol	Propafenona
Risperidona	Sertralina	Reboxetina
Terfenadina	Tioridazina	Terbinafina
Ticlopidina	Yohimbina	Venlafaxina

(Tomado de *Abraham y Adithan, 2001*).

Uno de los aspectos importantes a resaltar es la capacidad que tienen algunos xenobióticos para inducir la actividad de los diversos citocromos P450. La inducción de la actividad enzimática tiene consecuencias sobre el metabolismo de los propios inductores o sobre otros xenobióticos que ingresan al organismo.

**Tabla 5.** Función de algunas familias de CYP y agentes inductores

Familia	Nombre trivial	Función	Agente inductor
CYP 1 (P450 I)	A1 P448 P450c (ratas)	Activa mutágenos y carcinógenos	TCDD, 3- metilcolantreno, benzopireno.
	A2 P448		Safrol (aceite de canela, nuez moscada)
CYP 2 (P450 II)	A1 P450a (ratas)	Destoxificación de xenobióticos.	3-metilclantreno, fenobarbital
	B1 P450b (ratas)		fenobarbital, DDT, dieldrin, insecticidas clorados
	B2 P450e (ratas)		
	C1-10		
	D1, D2	---	
E P450 j	Activa nitrosaminas	etanol, benceno	
CYP 3 (P450 III)	A1 P450 (ratas)	Destoxifica xenobióticos	Clotriazol, pregnenolona
CYP 4 (P450 IV)		Proliferación peroxisomal	Clofibrato, di-(2- etilhexil)ftalato

(Tomado de *Murray y Reidy, 1990*).

Al contrario de muchos miembros de la familia de enzimas CYP (Tabla 5), la enzima CYP2D6 no es afectada por los inductores enzimáticos clásicos como fenobarbitona (*Eichelbaum y cols, 1986*). El tratamiento con rifampicina proporcionó un incremento de 30% en la depuración de esparteína, pero el radio metabólico no fue modificado significativamente (*Eichelbaum y cols, 1986*).

Se ha observado una reducción alrededor del 33% en el radio metabólico (MR) de debrisoquina en mujeres metabolizadoras extensas (EM) cuando usan anticonceptivos (*Kallio y cols, 1988*). También se observó un insignificante decremento en el MR de

debrisoquina durante el ciclo menstrual, comparado con la fase preovulatoria (*Wadelius y cols, 1997; Kashuba y cols, 1998*). Fumar cigarros y la ovariectomía inducen la actividad de esta enzima pero en menor grado (*Lennard, 1990*). En contraste, hay evidencia de que el embarazo tiene profunda influencia en la actividad de CYP2D6 (*Wadelius y cols, 1997*).

#### **II.2.4.- Importancia clínica del fenotipo CYP2D6**

Aunque CYP2D6 está relativamente de forma minoritaria en el hígado (1.5% del total de isoformas del citocromo P450), metaboliza hasta 25% de todos los fármacos prescritos actualmente en la práctica clínica (figura 8) y muchos de los fármacos que son metabolizados por CYP2D6 tienen como blanco el sistema nervioso central (*Kroemer y Eichelbaum, 1995; Wolf y Smith, 1999b*).

El polimorfismo de CYP2D6 representa un excelente ejemplo tanto para conocer las implicaciones clínicas potenciales de la Farmacogenética, como para saber el proceso por el cual la investigación farmacogenética llevó desde el fenotipo hasta el entendimiento del mecanismo molecular a nivel de genotipo (*Weinshilboum, 2003*). Éste es clínicamente más importante para los fármacos metabolizados por CYP2D6 entre ellos, antidepresivos tricíclicos, ciertos neurolépticos, antihipertensivos, antiarrítmicos,  $\beta$ -bloqueadores y derivados de morfina, por ejemplo, amitriptilina, codeína, norcodeína, dextrometorfán, imipramina, nortriptilina, metoprolol y propanolol (*May, 1994; Kroemer y Eichelbaum, 1995*). Para antidepresivos tricíclicos, el fenotipo PM de CYP2D6 es un riesgo incrementado de reacciones adversas (*Eichelbaum y Gross, 1990*).

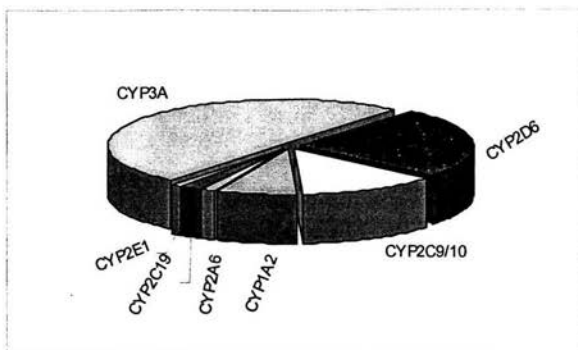


Figura 8. Proporción de fármacos metabolizados por los principales citocromos P450 (González, 1992).

Debido al alto carácter polimórfico del gen *CYP2D6*, la enzima *CYP2D6* es también el sitio de un número de interacciones farmacológicas *in vivo*, lo cual tiene importancia en la clínica. Los sustratos con alta afinidad por la enzima se unen fuertemente a ella e inhiben el metabolismo de otros compuestos los cuales tienen baja afinidad. Consecuentemente las interacciones farmacológicas ocurren tanto en metabolizadores extensos como pobres (Eichelbaum y Gross, 1990). Con este conocimiento, se pueden anticipar las interacciones farmacocinéticas con el siguiente razonamiento:

*Si el fármaco A afecta a una determinada enzima P450 X y ésta metaboliza los fármacos B, C y D, entonces A afectará el metabolismo de los fármacos B, C y D.*

Este razonamiento es utilizado para decidir qué fármacos se desarrollarán y eliminar las interacciones entre ellos, porque la inhibición de las enzimas en muchos casos no es el objetivo del tratamiento (Preskorn, 1996).

La interacción de dos sustratos de *CYP2D6* puede resultar en numerosas respuestas clínicas, incluidas respuestas que causen efectos no deseados. El metabolismo de primer paso del sustrato puede ser inhibido o la tasa de eliminación puede ser prolongada de tal manera que pueden ocurrir altas concentraciones plasmáticas y respuestas farmacodinámicas asociadas (Eichelbaum y Gross, 1990; Kohler y cols, 1997; Ozdemir y cols, 1997; Cai y cols, 1999; Naranjo y cols, 1999; Somer y cols, 2000; Stanford y Stanford, 1999).

La inhibición del metabolismo de *CYP2D6* puede también conducir a la disminución de la respuesta terapéutica cuando la acción farmacológica es dependiente del metabolito activo (*Lennard y cols, 1983; Linder y cols, 1997*).

La importancia de la determinación del polimorfismo de *CYP2D6* es el valor clínico para predecir las respuestas inadecuadas o adversas a ciertos agentes terapéuticos y predecir o prevenir el riesgo incrementado de enfermedades relacionadas con la exposición ocupacional o medioambiental (*Marez y cols, 1997; Abraham y Adithan, 2001*).

En lugar de proveer información simplemente descriptiva por monitoreo de la terapia farmacológica, la genética molecular puede producir información a cerca de por qué un paciente requiere una dosis, un fármaco o un régimen de tratamiento diferente antes de que la terapia sea instituida (*Chen y cols, 1996*). Esto también puede reducir substancialmente la necesidad de hospitalización debido a reacciones adversas lo cual disminuiría los costos en instituciones de salud.

La participación de *CYP2D6* y sus variantes alélicas en la patogénesis de ciertas enfermedades, por activación de xenobióticos o por participación en el metabolismo de neurotransmisores, es un área interesante y aún pendiente de investigación (*Kroemer y Eichelbaum, 1995*). Por ejemplo, los polimorfismos de *CYP2D6* se han relacionado con varias enfermedades, incluidos ciertos cánceres (pulmón y vejiga), inicio temprano de enfermedad de Parkinson, lupus eritomatoso sistémico, adenoma hipofisiario, nefropatía Balkon y espondilitis anquilosante, entre otras. (*Lennard, 1990; Meyer y cols, 1990; Daly y cols, 1994; Kelsey y cols, 1997; Marez y cols, 1997; Kortunay y cols, 1999*).

### **II.3.- De la Farmacogenética a la Farmacogenómica**

Es probable que las primeras observaciones farmacogenéticas las realizara Pitágoras en el año 510 a C, quien reconoció al favismo como "el peligro que corren algunos individuos, pero no otros, al comer habas". En la actualidad se sabe que este trastorno es una anemia hemolítica que se presenta por la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*Beutler, 1991*). En 1957, Motulsky fue el primero en sugerir que ciertas reacciones adversas a los medicamentos podrían ser causadas por variaciones,

determinadas genéticamente, en la actividad del metabolismo a nivel hepático. Poco después, Vogel en 1959 acuñó el término Farmacogenética para describir la relación entre la constitución genética de un individuo y la terapia farmacológica. Por lo tanto, la Farmacogenética estudia la variación genética responsable de las diferencias individuales en la respuesta a los fármacos y xenobióticos. Posteriormente, el término Farmacogenética se amplió al de Ecogenética, para abarcar las diferencias genéticas que determinan la susceptibilidad de los individuos a la acción de agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente (Nebert, 1997).

La variabilidad genética en el nivel de expresión o función de las DME tiene un efecto significativo en la eficacia terapéutica (Weber, 1997). Además, numerosos estudios epidemiológicos relacionan las diferencias alélicas de las DME con toxicidad y cáncer (Cervantes y cols, 2001). En la tabla 6 se muestran los principales polimorfismos farmacogenéticos en las DME y algunas enfermedades relacionadas.

En el pasado, los estudios de eficacia y seguridad de los fármacos se desarrollaron en el supuesto de una persona promedio, ignorando el hecho de que los seres humanos muestran una diversidad genética extraordinaria (Housman y Ledley, 1988). De hecho, se han observado reacciones adversas a un gran número de fármacos y a este respecto las cifras son impactantes. Solamente durante 1994, en Estados Unidos, se estima que se presentaron más de dos millones de pacientes hospitalizados a causa de serias reacciones adversas a los fármacos resultando en 106 000 muertes. Estos datos sitúan a las reacciones adversas a fármacos como la 5ª causa de muerte en ese país (Lazarou y cols, 1998).

El impacto del estudio del genoma humano en las ciencias farmacéuticas aún no es cuantificable, pero no hay duda que potenciará positivamente las estrategias farmacéuticas y la práctica médica tradicional. El principal esfuerzo se enfoca a entender el significado de la variación genética de los genes implicados en la respuesta a fármacos que determinan la eficiencia y toxicidad de éstos. Este conocimiento ya ha dado como resultado el nacimiento de una nueva disciplina, la Farmacogenómica, que se define como la aplicación de la tecnología genómica al desarrollo de fármacos y esquemas terapéuticos diseñados para lograr ensayos clínicos más exitosos y terapéuticos más efectivos y menos tóxicos. La Farmacogenómica incluye no solo la



farmacodinámia, el mecanismo de acción de un fármaco sobre su blanco, sino también la farmacocinética. La Farmacogenómica como disciplina emerge de la Farmacogenética y del uso de técnicas moleculares tradicionales para estudiar las diferencias en los genes individuales que codifican para las proteínas que participan en las vías del metabolismo de fármacos (*Wallace, 1999; Destenaves y Tomas, 2000*).

Son muchos los beneficios potenciales que puede aportar la Farmacogenómica al desarrollo de nuevos fármacos; por ejemplo, identificando a tiempo en cuáles pacientes se presentará éxito terapéutico o alta toxicidad para un compuesto dado, ya que se conocería la existencia de una predisposición genética en relación con ese resultado. Asimismo, se podrá pensar en evaluar nuevamente aquellos fármacos que en el pasado no tuvieron éxito ya que presentaban poca eficacia o alta toxicidad en estudios clínicos abiertos (*Marshall, 1977*). También, usando criterios farmacogenómicos, los estudios clínicos de fase III podrán requerir un menor número de pacientes, ya que la selección se haría de acuerdo con el perfil genético que tuvieran, lo que resultaría en menores costos y resultados más precisos (*Cervantes y cols, 2001*).

**Tabla 6.** Principales polimorfismos farmacogenéticos en las DME.

Gen	Enzima	Fenotipo	Riesgo de enfermedades	Ejemplos de fármacos metabolizados
CYP2D6	Citocromo P450 2D6 Hidroxilasa de debrisoquina	PM	2-2.5% Enfermedad de Parkinson	Debrisoquina, codeína, nortriptolina, dextrometorfán
		EM	> incidencia cáncer de vejiga, hígado, faringe, estómago. Cáncer de pulmón en fumadores	
CYP2C9	Citocromo P450 2C9	PM	Gran variabilidad	Tolbutamida, diacepam, ibuprofeno, warfarina
CYP2C19	Citocromo P450 2C19	PM	Efectos colaterales por mefenitoína en SNC, rash cutáneo, fiebre, adenopatías generalizadas y discrasias sanguíneas	Mefenitoína, omeprazol, proguanilo, citalopram
NAT2	N-acetil transferasa 2	PM	Neuropatías periféricas, LES, riesgo de cáncer de vejiga y de mama en fumadoras	Isoniazida, procaínamida, sulfonamidas, hidralazinas
		EM	> riesgo de cáncer de hígado y colorrectal	
TPMT	Tiopurinametil transferasa	PM	ND	6-mercaptapurina, 6-tioguanina, azatioprina
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Deficiencia	Anemia hemolítica	Ac nalidíxico, nitrofurantoína, sulfas, fenilhidrazina, primaquina
		Actividad aumentada	Susceptibilidad a infección por <i>Plasmodium sp</i>	

(Tomado de Nebert 1997 y Weber 1997)

PM= Metabolizadores lentos o pobres, EM= Metabolizadores rápidos o extensos, ND= No determinado

Evidentemente la Farmacogenética y la Farmacogenómica, como áreas de investigación emergentes, tendrán repercusiones importantes en la práctica profesional del farmacéutico ya que serán de los profesionales más comprometidos en la personalización de la terapia de acuerdo con las características del paciente. Por lo tanto, la necesidad urgente de incorporar estas disciplinas en los planes curriculares de las carreras farmacéuticas resulta indiscutible (*Cervantes y cols, 2001*).

Por otro lado, puesto que la generación de datos farmacogenómicos requiere del acceso a la información confidencial de pacientes como son las historias clínicas, resultados de sus análisis de laboratorio, evaluaciones psicológicas, evolución del tratamiento, iatrogenias, etc. Se han realizado muchos cuestionamientos, y el debate continúa sobre aspectos éticos y legales que resultarían involucrados al momento de compartir la información de bases de datos que se suponen confidenciales y privadas (*Goodman, 1996*).

#### **II.4.- Genética molecular en el laboratorio clínico.**

##### **II.4.1. Genotipificación.**

La genotipificación en Farmacogenética involucra la identificación de mutaciones genéticas definidas que ocasionan el fenotipo particular de metabolismo de fármacos. Estas mutaciones incluyen alteraciones genéticas que llevan a sobre expresión (amplificación del gen), ausencia de un producto proteínico activo (alelo nulo), o producción de una proteína mutante con capacidad catalítica disminuida (alelo inactivo) (*Linder y cols, 1997*).

El ácido desoxirribonucleico (DNA *Deoxyribonucleic Acid*), genómico aislado de sangre periférica puede ser utilizado para genotipificación. Un método comúnmente empleado es PCR-RFLP (*Linder y cols, 1997*). En esta técnica, una región específica del gen de interés es amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) con posterior digestión del producto amplificado con endonucleasas de restricción. El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) ha sido un método ampliamente utilizado para identificar

diferentes alelos de *CYP2D6*. El tamaño de los productos de digestión son fácilmente evaluados por electroforesis en gel de agarosa o acrilamida teñido con bromuro de etidio y transiluminación UV (*Linder y cols, 1997; Sachse y cols, 1997*).

La técnica PCR fue descrita por el investigador Kary Mullis en 1985, por cuyo trabajo recibió el Premio Nobel en 1990. La PCR es una técnica potente que permite la amplificación de segmentos de manera directa a partir del DNA genómico o del cDNA. Este método está encontrando un uso cada vez mayor porque evita parte de la complejidad técnica y del tedio de la clonación. Cuando se clonan o amplifican mediante PCR, las mutaciones se secuencian con facilidad mediante variaciones en dos métodos básicos: el método de desintegración química de Maxam-Gilbert, y con mayor frecuencia, el método de Sanger, también denominado el método enzimático o de terminación de cadena didesoxi (*Panduro, 2000*).

El método de PCR se basa en la amplificación, aproximadamente de  $10^9$  veces, de un segmento de DNA, a partir de secuencias cortas iniciadoras (oligonucleótidos) del segmento deseado, así como la presencia de los dNTP's y de la Taq polimerasa. Este método se lleva a cabo en ciclos de tres etapas que consisten en:

94°C	Desnaturalización inicial	1 ciclo
94°C	Desnaturalización	
55-65°C	Alineación	30-35 ciclos
68-72°C	Elongación	
72°C	Extensión final	1 ciclo
4°C	Estabilización.	

### III. JUSTIFICACIÓN.

Considerando que:

- Las reacciones adversas a los fármacos son más frecuentes en los individuos de fenotipo PM, que incluye el alelo *CYP2D6\*10*.
- Las duplicaciones en el gen *CYP2D6* típicas de los individuos UM impiden que se alcance los niveles terapéuticos y por lo tanto el efecto farmacológico.
- No se conoce la frecuencia alélica de *CYP2D6\*10* y de duplicaciones del gen *CYP2D6* en población mexicana.

Se decidió investigar la mutación principal que define al alelo *CYP2D6\*10* y las duplicaciones en el gen *CYP2D6* en una muestra de individuos mexicanos.

Esta investigación también tiene como finalidad contribuir al conocimiento de la estructura genética de la población mexicana.

### IV. OBJETIVOS.

- Identificar la mutación que define al alelo *CYP2D6\*10* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la generación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), para conocer la frecuencia de dicho alelo en una muestra de población mexicana.
- Determinar la presencia de duplicaciones en el gen *CYP2D6* y calcular su frecuencia en una muestra de población mexicana.
- Comparar los resultados obtenidos con los reportados en otras poblaciones.

### V. HIPÓTESIS.

La población mexicana tendrá una frecuencia de alelos de *CYP2D6* diferente a la reportada para otras poblaciones.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

### VI.1.- Materiales y equipo.

#### **Reactivos**

- Agarosa
  - TBE 10X, 1X, 0. 5X
- Solución de Tris-base, ácido bórico y ácido etiléndiaminotetracético (EDTA)
- Bis-acrilamida
  - Acrilamida
  - Solución de etanol 70%
  - RCLB  
(Solución de lisis de células rojas)
  - Agua inyectable estéril
  - Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
  - Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
  - Fenol saturado
  - Isopropanol
  - Oligonucleótidos
  - Dimetilsulfóxido
  - Taq polimerasa
  - Desoxirribonucleótidos trifosfatados
  - Solución de  $MgCl_2$  15mM
  - Enzimas de restricción
  - Bromuro de etidio
  - Dodecil sulfato de sodio 10%
  - Solución de NaCl 5mM y solución saturada de NaCl

#### **Equipo**

- Espectrofotómetro (Beckman DU-64)
- Balanza analítica (Shimadzu 220 g)
  - Campana de extracción de flujo laminar (Veco)
  - Micro centrifuga (Qualitron)
  - Cámara fotográfica
  - Transiluminador de luz UV
  - Centrifuga (5804 R Eppendorf)
  - Cámara de electroforesis vertical (V16 BRL Life Technologies)
  - Cámara de electroforesis horizontal (Horizon 58 Gibco BRL)
  - Termociclador (Master cycler gradient Eppendorf)
  - Pipetas semiautomáticas (Gilson) de 20, 100, 200 y 1000  $\mu$ L
  - Fuente de poder (EC-90)
  - Bomba de vacío

## VI.2.- Metodología

Para participar en este estudio se consideraron los siguientes criterios de inclusión: ser mexicano por nacimiento con padres y abuelos mexicanos también por nacimiento, ser mayor de 18 años, no estar tomando algún medicamento y en el caso de mujeres no estar embarazadas. Todos los participantes leyeron y firmaron una carta de consentimiento informado. Se extrajeron muestras de sangre periférica a 144 individuos sanos, mestizo-mexicanos con edad promedio de 24.25 años en un rango de 20 a 46 años. Se obtuvo el DNA genómico. Se investigó la mutación para el alelo *CYP2D6\*10* a 106 muestras y a 127 muestras se les investigó la presencia de duplicaciones del gen *CYP2D6*.

### VI.2.1. Obtención del material genético

Extracción de DNA de sangre periférica.

- **Extraer asépticamente 20 mL de sangre periférica**

*Lisis de glóbulos rojos.*

1. Homogenizar la sangre y colocarla en un tubo cónico.
2. Enjuagar el tubo de ensayo con solución de lisis de células rojas (RCLB).
3. Llenar el tubo con RCLB y nivelar los tubos por parejas.
4. Agitar cuidadosamente durante 8-10 minutos.
5. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante hasta la mitad, agregar más RCLB.
7. Repetir los pasos 4 al 6 dos veces más.
8. Cuando el botón de células ya esté limpio, eliminar completamente el sobrenadante

*Extracción de DNA*

1. Resuspender el botón de células blancas en 886  $\mu$ L de NaCl 5mM.
2. Agregar 46  $\mu$ L de SDS 10%. Resuspender.
3. Adicionar 308  $\mu$ L de NaCl saturado. Resuspender.
4. Dividir el volumen en dos tubos de 1.5mL.
5. Centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 20 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5mL limpio y desechar el botón.
7. Agregar al sobrenadante fenol saturado (volumen a volumen).
8. Mezclar suavemente durante 8-10 minutos.

9. Centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
  10. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5mL limpio.
  11. Adicionar al sobrenadante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico volumen a volumen.
  12. Mezclar suavemente durante 8-10 minutos.
  13. Centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
  14. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5mL limpio.
  15. Adicionar cloroformo-alcohol isoamílico volumen a volumen.
  16. Mezclar suavemente durante 8-10 minutos.
  17. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5mL limpio.
  18. Agregar al sobrenadante isopropanol frío volumen a volumen.
  19. Mezclar suavemente hasta que termine de precipitar el DNA.
- \*\* Cuando el DNA flota libremente ha finalizado la precipitación.

#### *Lavado de DNA*

1. Centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
2. Decantar el isopropanol.
3. Agregar etanol al 70% frío al botón.
4. Resuspender y centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10-15 minutos.
5. Lavar dos veces más.
6. Secar el DNA en la centrifuga de vacío.
7. Resuspender el DNA con 200-500  $\mu$ L de agua inyectable y e incubar en baño maría a 50°C por lo menos dos horas.

#### **VI.2.2. Cuantificación de DNA**

Para utilizar el DNA genómico extraído es necesario conocer la concentración y la pureza del mismo.

Calcular de la siguiente manera:

1. Diluir 5  $\mu$ L de DNA en 495  $\mu$ L de agua inyectable (dilución 1:100).
2. Leer la absorbancia en 260 y 280 nm.

*Análisis de pureza:*



1. Calcular la relación entre la densidad óptica a 260 y 280 nm.

El DNA está suficientemente puro, si el resultado está entre 1.8 y 2.0 (Sambrook, 1989)

*Análisis de concentración:*

1. Se utiliza la siguiente relación: 1 D.O equivale a 50 µg /mL y se tiene que considerar la dilución de la siguiente manera:

$$[DNAng / \mu L] = D.O_{260nm} \times \left[ \frac{50 \mu g}{1 mL} \right] \times \left[ \frac{100 mL}{1 mL} \right] \times \left[ \frac{1000 ng}{1 \mu g} \right] \times \left[ \frac{1 mL}{1000 \mu L} \right]$$

### VI.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

1. Hacer un gel de agarosa con una concentración final de 0.8% o 2.0%, según el tamaño del DNA.
2. Disolver la agarosa con solución TBE 0.5X; calentar hasta disolver completamente.
3. Una vez que el gel haya enfriado aproximadamente a 40°C, verter en la cámara de electroforesis y colocar el peine adecuado. Dejar enfriar y retirar el peine.
4. Cubrir el gel con solución TBE 0.5X y cargar las muestras mezcladas con amortiguador de carga\* dentro de los pozos.
5. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder y establecer una corriente de 100 voltios.
6. Teñir el gel con bromuro de etidio 0.5 µg/mL durante 10 segundos y visualizar con transiluminación de luz UV

\* amortiguador de carga: mezcla de azul de bromo fenol, xilén cianol y ficoll.

### VI.2.4. Electroforesis en gel de acrilamida al 8%

1. En un vaso de precipitado verter los siguientes reactivos con agitación constante:

Solución de acrilamida 40%	14 mL
Agua desionizada	48.3 mL
Solución TBE 10X	7.0 mL

Solución de persulfato de amonio 10%	0.7 mL
TEMED	0.042 mL

2. Verter la mezcla en medio de dos vidrios previamente lavados y secos, acoplados con separadores e inmediatamente colocar el peine.
3. Dejar polimerizar 30 minutos, retirar el peine y colocar los vidrios en la cámara vertical.
4. En seguida, llenar los compartimentos de la cámara con solución TBE 1X y lavar los pozos para retirar el exceso de acrilamida.
5. Mezclar las muestras se con colorante y cargarlas en los pozos.
6. Tapar y conectar la cámara a la fuente de poder. Aplicar una corriente de 240 a 260 voltios.
7. Para evaluar el resultado, teñir el gel con bromuro de etidio 0.5 µg/mL durante 10 segundos y observar con transiluminación de luz UV

#### **VI.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

1. Colocar de 300-500 ng de DNA genómico en un microtubo de 500µL para PCR
2. Aparte en un tubo de 500µL hacer una mezcla con los siguientes reactivos:
  - dNTP's
  - MgCl<sub>2</sub> 15mM
  - Oligonucleótido 5'- 3'
  - Oligonucleótido 3'-5'
  - Enzima Taq polimerasa
  - Dimetil sulfóxido
3. Adicionar 22µL de la mezcla anterior al tubo de 500µL que contiene el DNA
4. Colocar los tubos en el termociclador previamente programado.
5. Almacenar a -20°C hasta su visualización o posterior digestión.

#### **VI.2.6. Amplificación de la región de interés de *CYP2D6*\*10**

Oligonucleótidos específicos para el fragmento del gen *CYP2D6* donde se encuentra la

mutación C<sub>188</sub> --> T que define al alelo *CYP2D6\*10* (Sachse y cols 1997):

CYP2D6\*10 A 5'- TCA ACA CAG CAG GTT CA -3' (17 pb)

CYP2D6\*10 B 5'- CTG TGG TTT CAC CCA CC -3' (17 pb)

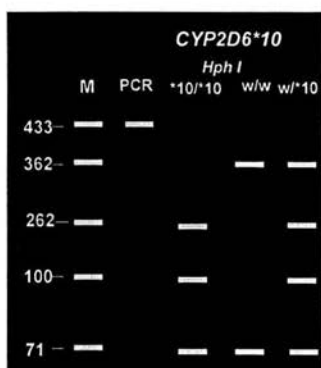
Reacción en Cadena de Polimerasa		Programa
2D6*10 A (100 ng/μl)	1.0 μl	94°C-2'
2D6*10 B (100 ng/μl)	1.0 μl	40 ciclos: 94°C-30" 58°C-10" 72°C-1.5'
Master Mix	15.0 μl	
DMSO 5%	1.5 μl	
DNA genómico (100 ng/μl)	3.0 μl	
Agua	3.5 μl	4°C-α
Volumen total	25.0 μl	Duración: 2.5 horas

Reacción de Restricción		Incubación
<i>Hph</i> I (5 U/μl) (Sachse y cols 1997)	0.2 μl	37°C 4 horas  Sitio de corte: 5'-CC/(A,T)GG-3'
Amortiguador	2.0 μl	
DNA <sub>PCR</sub>	10.0 μl	
Agua	7.8 μl	
Volumen total	20.0 μl	

#### VI.2.6.1 Resultados posibles de los genotipos para el alelo *CYP2D6\*10*

El fragmento de DNA del gen *CYP2D6* que comprende la mutación C<sub>188</sub> --> T es de 433 bases (figura 9), el alelo silvestre tiene un sitio de reconocimiento donde corta la enzima de restricción generando un fragmento de 362 bases y un fragmento de 71 bases.

Cuando está presente la mutación se genera otro sitio de corte y los fragmentos que resultan son de 262, 100 y 71 bases, con este patrón de bandas se identifica al alelo *CYP2D6\*10*. Los genotipos heterocigotos se identifican con la combinación de estos dos patrones, es decir, se obtienen fragmentos de 362, 262, 100 y 71 bases.



**Figura 9.** Representación esquemática de los posibles resultados para el genotipo de *CYP2D6\*10*. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: producto amplificado de PCR, carril 3: muestra homocigota mutante para *CYP2D6\*10*, carril 4: muestra homocigota silvestre, carril 5: muestra heterocigota.

#### VI.2.7. Amplificación de la región de interés de para *CYP2D6\*X* (MxN)

Oligonucleótidos específicos para identificar la presencia de duplicaciones del gen *CYP2D6* (Lovlie y cols, 1996)

CYP17 5'- TCC CCC ACT GAC CCA CAT CT -3' (20 pb)

CYP32 5'- CAC GTG CAG GGC ACC TAG AT -3' (20 pb)

#### Reacción en Cadena de Polimerasa

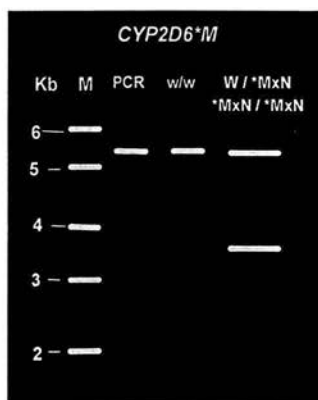
#### Programa

<b>CYP17</b> (100 ng/μl)	2.0 μl	93°C -2'
		35 ciclos 93°C -10"
		63°C -30"
<b>CYP32</b> (100 ng/μl)	2.0 μl	68°C -40'
		68°C -7'

dNTP	1.75 $\mu$ l c/u	4°C - $\alpha$
		Duración 3.5 horas
Mezcla de polimerasas (Taq + Pwo)	0.75 $\mu$ l	
DMSO 5%	2.5 $\mu$ l	
DNA genómico (100 ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l	
Agua	27.75 $\mu$ l	
Volumen total	50 $\mu$ l	

### VI.2.7.1. Resultados posibles de la investigación de la duplicación del gen *CYP2D6*

El tamaño del fragmento de DNA amplificado cuando hay un sola copia del gen es de 5.2 kilo bases (kb) y cuando existe duplicación se amplifica un fragmento adicional de 3.6 kb (figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática de los posibles resultados para el genotipo de *CYP2D6* con genes duplicados. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: producto amplificado de PCR, carril 3: muestra homocigota silvestre para *CYP2D6*, carril 4: muestra heterocigota (un alelo con un solo gen y otro alelo con duplicación) o muestra homocigota mutante (ambos alelos duplicados).

## VII. RESULTADOS.

### VII.1. Identificación del alelo *CYP2D6\*10*

Se realizó el análisis de pureza e integridad de DNA a 106 muestras de sujetos meztizo-mexicanos y se amplificó por PCR el fragmento del gen *CYP2D6* de 433 kb que comprende la mutación  $C_{188} \rightarrow T$  como se describe en la metodología.

En la figura 11 se muestra la fotografía de un gel de acrilamida 8% con el resultado de la amplificación para el alelo *CYP2D6\*10* y digestión de cinco muestras, donde se observan: una muestra con genotipo heterocigoto *wt/CYP2D6\*10* (*wt Wild Type*), tres muestras con genotipo silvestre *wt/wt* y una muestra homocigota mutante *CYP2D6\*10/CYP2D6\*10*.

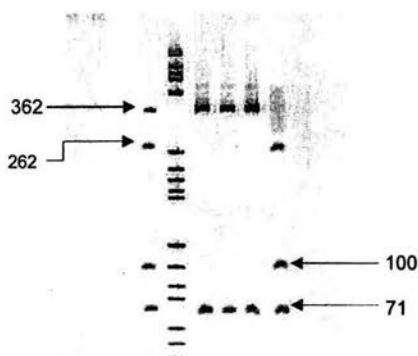


Figura 11. Imagen de un gel de acrilamida 8%. Carril 1: muestra heterocigoto *wt/CYP2D6\*10*, carril 2: marcador de peso molecular, carriles 3-5: muestras homocigotos silvestres *wt/wt*, carril 6: muestra homocigoto mutado *CYP2D6\*10/CYP2D6\*10*

La frecuencia total y dividida por género de genotipos obtenidos y alélica se muestra en la tabla 7.

Tabla 7.- Frecuencia genotípica y alélica de *CYP2D6\*10* en 106 muestras de individuos mexicanos

Genotipos	Frecuencia %		
	Hombres (n)	Mujeres (n)	Total
*wt*wt	31.13 (33)	48.11(51)	79.24 (84)
*wt*10	8.49 (9)	10.38 (11)	18.87 (20)
*10*10	0 (0)	1.89 (2)	1.89 (2)

Alelos			
*1	35.37 (75)	53.31 (113)	88.68 (188)
*10	4.22 (9)	7.10 (15)	11.32 (24)

## VII.2. Identificación de duplicaciones del gen *CYP2D6*

Se realizó el análisis de pureza e integridad de DNA a 127 muestras de sujetos meztizo-mexicanos y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean una región intergénica conservada y repetida de 5.2kb del *locus CYP2D* localizada entre el pseudogen *CYP2D7P* y el gen *CYP2D6*, misma que aparece entre dos genes *CYP2D6* con un tamaño de 3.6 kb (figura 12).

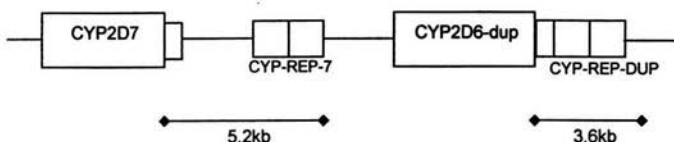


Figura 12. Esquema representativo de las regiones amplificadas para detectar duplicaciones del gen *CYP2D6* (Tomado de Lovlie y cols, 1996 con modificaciones)

En la figura 13 se muestra el resultado de la amplificación de las regiones específicas para conocer la presencia o ausencia de duplicaciones del gen *CYP2D6*.

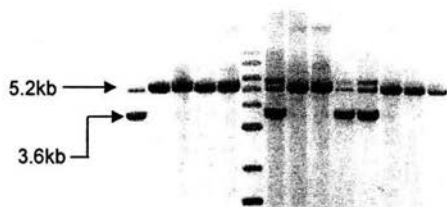


Figura 13. Imagen de un gel de agarosa 2%. Carriles 1,7,10 y 11: muestras con genes *CYP2D6* duplicados, carril 6: marcador de peso molecular, carriles 2-5, 8,9 y 12-14: muestras con una sola copia del gen *CYP2D6*

La distribución de frecuencias, por género y totales, para las duplicaciones del gen *CYP2D6* se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.**-Frecuencia de duplicaciones del gen *CYP2D6* en 127 muestras de individuos mexicanos

Duplicación	Frecuencia (%)		
	Mujeres (n=81)	Hombres (n=46)	Total (n=127)
Si	6.28 (8)	7.1 (9)	13.38 (17)
No	57.48 (73)	29.14 (37)	86.62 (110)



## VIII. DISCUSIÓN.

La Farmacogenética estudia la variación genética responsable de las diferencias individuales en la respuesta a los fármacos y xenobióticos (*Nebert, 1997*). La identificación de los genes responsables de las diferencias individuales en la respuesta a fármacos establecerá nuevas rutas terapéuticas de inmenso beneficio médico (*Hoeche, 2003*).

Las diferencias farmacogenéticas entre individuos de un mismo grupo étnico pueden ser de diez a más de cuarenta veces, mientras que la variación media entre grupos étnicos es raramente más de dos a tres veces. Esta observación es el sello de la herencia de las características complejas o multifactoriales, por ejemplo la contribución de múltiples genes y de los factores ambientales sobre estos genes. El concepto que ahora está surgiendo es que la cantidad de alelos que codifican para las características utilizadas comúnmente para categorizar 'raza o grupo étnico' (color de la piel, textura y color del cabello y rasgos faciales, entre otros) será bastante pequeña comparada con el número de los alelos que codifican las diferencias interindividuales, aún dentro del mismo grupo étnico; lo mismo se predice cierto para los alelos que dirigen por ejemplo, las variaciones de presión sanguínea y la capacidad para metabolizar fármacos. La idea de dividir a las poblaciones por etnias ha tenido ventajas en el estudio de los rasgos que son expresados predominantemente en poblaciones específicas, pero no siempre es una estrategia garantizada. La estrategia más exitosa para investigar los efectos alélicos, requiere probablemente de una selección juiciosa de la población de estudio basada en el conocimiento del rasgo que será estudiado. Por lo tanto, es imperativo que el investigador clínico esté conciente y aprecie la riqueza y diversidad de los alelos que existen en cada grupo étnico para el diseño de estudios farmacogenómicos (*Nebert y Menon, 2001*).

Las enzimas metabolizadoras de fármacos (DME) están ampliamente distribuidas en todo el organismo y se encuentran en varios compartimientos subcelulares. Sin embargo, en vertebrados, el hígado es la fuente más rica de enzimas que catalizan reacciones de biotransformación (*Bertilsson y cols, 1997; Marez y cols, 1997; Klassen y Watkins, 1999*). Las enzimas P450 microsómicas hepáticas tienen una participación muy

importante en la determinación de la intensidad de acción de fármacos y la duración de la misma, pero también intervienen en la detoxificación de xenobióticos (*Masimirembwa y cols, 1993; Klassen y Watkins, 1999; Matsunaga y cols, 2001; Matsunaga y cols, 2002*). Aunque la enzima CYP2D6 está relativamente de forma minoritaria en el hígado (1.5% del total de isoformas del citocromo P450), metaboliza hasta 25% de todos los fármacos prescritos actualmente en la práctica clínica y muchos de los fármacos que son metabolizados por CYP2D6 tienen como blanco el sistema nervioso central (*Kroemer y Eichelbaum, 1995; Wolf y Smith, 1999b*).

El polimorfismo del gen *CYP2D6* representa un excelente ejemplo tanto para conocer las implicaciones clínicas potenciales de la Farmacogenética, como para saber el proceso por el cual la investigación farmacogenética llevó desde el fenotipo hasta el entendimiento del mecanismo molecular a nivel de genotipo (*Weinshilboum, 2003*). Este polimorfismo es clínicamente importante para los fármacos que son sustratos de CYP2D6 entre los que se encuentran antidepresivos tricíclicos, ciertos neurolépticos, antihipertensivos, antiarrítmicos,  $\beta$ -bloqueadores y derivados de morfina, por ejemplo, amitriptilina, codeína, norcodeína, dextrometorfán, imipramina, nortriptilina, metoprolol y propranolol (*May, 1994; Kroemer y Eichelbaum, 1995*). Además se sabe que el fenotipo PM de CYP2D6 presenta mayor riesgo de reacciones adversas (*Eichelbaum y Gross, 1990*).

El cambio C<sub>188</sub> → T causa la sustitución del aminoácido Pro<sub>34</sub> → Ser, el cual se sabe que produce una enzima inestable con actividad catalítica disminuida (*Kagimoto y cols, 1990; Johansson y cols, 1994; Marez y cols, 1997*) y está presente en tres formas comunes del gen *CYP2D6* en la población asiática: *CYP2D6\*10A* (nombre trivial *CYP2D6\*J*); el *CYP2D6\*10B* (nombre trivial *CYP2D6\*Ch 1*) (*Yokota y cols, 1993; Johansson y cols, 1994*); y el alelo *CYP2D6\*10C* que tiene las mismas mutaciones de *CYP2D6\*10B*, además de una conversión génica en el exón 9, lo cual causa un producto enzimático casi inactivo (*Johansson y cols, 1994; Roh y cols, 1996*). La mutación C<sub>188</sub> → T es considerada como responsable del metabolismo lento en los asiáticos en contraste con el metabolismo extenso en los caucásicos (*Yokota y cols, 1993; Wang y cols, 1993; Johansson y cols, 1994; Marez y cols, 1997*).

Aunque las bases moleculares del polimorfismo de *CYP2D6* han sido investigadas en

diferentes poblaciones, actualmente hay pocos estudios realizados en la población mexicana. En este trabajo se presenta el resultado del análisis de 144 muestras de sujetos mestizo-mexicanos de las cuales a 106 se les investigó la mutación que define al alelo *CYP2D6\*10* y a 127 la presencia de duplicaciones del gen *CYP2D6*.

En la tabla 9 se muestran los datos, ordenados de manera creciente, para la frecuencia alélica de *CYP2D6\*10* reportada en diferentes poblaciones y la obtenida en la muestra de población mestizo-mexicana que fue de 11.32 %. Esta frecuencia es similar a la encontrada para la población etiope de 8.6% (*Akhillu y cols, 2002*), es superior a la reportada para los caucásicos (1.52%) y está por debajo de la frecuencia de *CYP2D6\*10* en las poblaciones coreana 51% (*Roh y cols, 1996*), china 50.7% (*Johansson y cols, 1994*), malaya 43.3% (*Gan y cols, 2002*) y japonesa 31.8-38.6% (*Abraham y Adithan, 2001*).

**Tabla 9.** Frecuencia del alelo *CYP2D6\*10* en diferentes poblaciones y en la población estudiada.

Población	Muestra (n)	Frecuencia del alelo <i>CYP2D6*10</i> (%)
Caucásica	589	1.52
Etiope	115	8.6
<b>Mexicana (este estudio)</b>	<b>106</b>	<b>11.32</b>
Japonesa	162	31.8-38.6
Malaya	30	43.3
China(en Suiza)	113	50.7
Coreana	152	51

(Tomada de *Roh y cols, 1996* con modificaciones (*Johansson y cols, 1994; Abraham y Adithan, 2001; Gan y cols, 2002*))

Por otra parte, se sabe que existen diferencias interétnicas en la frecuencia de metabolizadores ultra rápidos. Aproximadamente el 10% de las poblaciones del mediterráneo tienen genes *CYP2D6* duplicados, probablemente como resultado de la

migración musulmana alrededor de 750 d. C (*Agundez y cols, 1995; Bernal y cols, 1999; Aklillu y cols, 2002*). En general, la distribución de los alelos con genes múltiples de *CYP2D6* es compatible con un evento estable de duplicación génica en sólo una región del mundo llamada Arabia Saudita-Etiopía, que probablemente ocurrió hace alrededor de 3000-10000 años (*Ingelman-Sundberg, 2001*). Interesantemente, se sabe que una pronunciada inmigración árabe tomó lugar en España alrededor de 400 d. C y esto puede explicar la alta frecuencia de alelos duplicados en España comparada con la frecuencia en otras poblaciones caucásicas (*Aklillu y cols, 2002*). La elevada frecuencia de alelos *CYP2D6* duplicados y multiduplicados entre los etíopes ha llevado a pensar que factores como la dieta pueden ser importantes. Se cree que la dieta originaria de la población etíope ha ejercido gran presión induciendo duplicaciones génicas y/o causando selección natural de las personas que portan genes duplicados (*Aklillu y cols, 1996*). Aparentemente la herencia de amplificación de un gen fue descrita por primera vez, cuando se mostró que las partes de un gen "silencioso" de colina esterasa fueron amplificadas en un granjero y su hijo, quienes pertenecían a una familia expuesta a insecticidas organofosforados por varias generaciones. El evento inicial de amplificación probablemente ocurrió y fue seleccionado durante la espermatogénesis u ovogénesis para después ser heredado (*Johansson y cols, 1993*). Recientemente se ha demostrado la presencia de dos regiones repetidas CYP-REP flanqueando el locus *CYP2D6* (*Allorge y cols, 2001; Schur y cols, 2001*) y se ha propuesto que los alelos con duplicación *CYP2D6* pueden ser explicados como un evento recíproco de delección, involucrando las mismas unidades CYP-REP (*Lundqvist y cols, 1999*).

En la tabla 10 se muestran los datos de manera creciente para la frecuencia alélica de genes *CYP2D6* duplicados, reportada en diferentes poblaciones y la obtenida en este estudio que fue de 13.38%, la cual es similar a la frecuencia reportada en la población española 7-10% (*Agundez y cols 1995, Bernal y cols 1999*) y a la de árabes sauditas 20% (*McLellan y cols, 1997*), es mayor a la frecuencia encontrada en las poblaciones alemana 3.7% (*Sachse y cols, 1997*) y suiza 1 a 2% (*Dahl y cols, 1995*) y es casi la mitad de la frecuencia reportada para la población etíope 29% (*Aklillu y cols, 1996*).

**Tabla 10.** Frecuencia de duplicaciones (MxN) del gen *CYP2D6* en diferentes poblaciones.

Población	Muestra (n)	Frecuencia de duplicaciones MxN (%)
Coreana	152	0.3
Suiza	270	1.0
Nicaragüense	137	1.1
China	113	1.3
Alemana	589	1.5-2.0
Francesa	265	1.9
Turca	404	5.8
Tanzana	NR	7
Española	258	7.0-10
Mediterránea	NR	10
<b>Mexicana (este estudio)</b>	<b>127</b>	<b>13.38</b>
Árabe Saudita	101	21
Etíopes	122	29

(Tomada de *Abraham y Adithan, 2001* con modificaciones *Agúndez y cols, 1995; Bernal y cols, 1999*). NR = no reportado

La importancia de realizar estudios como éste en la población mestizo-mexicana y compararlo con los de otras poblaciones tiene dos principales utilidades: Primero, con esto se resalta el hecho de que las dosis terapéuticas para los medicamentos que se recetan en la práctica clínica, especialmente los de estrecho margen terapéutico, no pueden ni deben ser iguales para todos los individuos de una población y menos de poblaciones con importantes diferencias interétnicas. Por lo tanto, es probable que dentro de pocos años, cuando se haya completado el análisis de los polimorfismos a la mayoría de las enzimas metabolizadoras de fármacos, sea necesario reajustar las dosis actuales en algunas poblaciones y si es el caso de la población mexicana, entonces se aplicará el conocimiento generado con esta investigación. Segundo, el conocer los principales y más frecuentes polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas

metabolizadoras de fármacos (DME) en diferentes poblaciones guiará de manera concreta a la industria farmacéutica que se dedica a la investigación para el desarrollo de medicamentos, ayudará a reducir los costos que se generan por reacciones adversas e ineficacia terapéutica, con lo que se logrará diseñar fármacos personalizados, que sean completamente aprovechados y sin ninguna o con las menores consecuencias para quien lo necesite.

La farmacogenómica promete tener un importante impacto en los principales problemas de salud que se desarrollan en el mundo. Su capacidad para identificar nuevos blancos para el desarrollo de fármacos, junto con su potencial aplicación para identificar poblaciones identificadas que responderán favorablemente a un fármaco en particular, la sitúan en un lugar único como una tecnología capaz de superar las diferencias que actualmente existen en la aplicación de las técnicas genómicas en países ricos y pobres. No obstante, para realizar su verdadero potencial, se requerirá superar algunos retos legales, éticos, políticos y económicos. Para que esto ocurra, se requiere de la fuerte colaboración entre la industria, la academia, organizaciones no gubernamentales e internacionales. Simultáneamente se requerirá de la participación activa y más equitativa por parte de los investigadores de cada país para superar estos retos (Pang, 2003)

## IX. CONCLUSIONES

- Se identificó la mutación C<sub>188</sub>→ T que causa la sustitución del aminoácido Pro<sub>34</sub> → Ser, y define al alelo *CYP2D6\*10*, la frecuencia fue 11.32%
- La frecuencia de duplicaciones de *CYP2D6* obtenida en la muestra de población mexicana fue 13.38%
- Las frecuencias alélicas de *CYP2D6\*10* y *CYP2D6* 2xN (*CYP2D6* duplicado) en la muestra de población mestiza mexicana difieren con las reportadas en otras poblaciones, por lo que cada población tiene que genotipificar a sus propios individuos.
- Este trabajo contribuye al conocimiento de la estructura genética de la población mestiza mexicana.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abraham BK, Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6. *Indian J of Pharmacology* 2001;33:147-169.
2. Agundez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benitez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population, *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:265-269.
3. Akiyllu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles, *J of Pharmacol and Exp Ther*, 1996;278:441-446.
4. Akiyllu E, Herrlin K, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living in Ethiopia or in Sweden, *Pharmacogenetics*, 2002; 12:375-383.
5. Allorge D, Harlow J, Boulet O, Hayhurst GP, Chowdry J, Roth E, Crewe K, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Broly F, Tucker GT, Ellis SW. In-vitro analysis of the contribution of CYP2D6.35 to ultra-rapid metabolism, *Pharmacogenetics*, 2001; 11:739-741.
6. Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, 1999; 9:657-660.
7. Bertilsson L, Dahl ML, Tybring G. Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1997;391:14-21.
8. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *N Eng J Med* 1991;324:169-174.
9. Brosen K, Nielsen PN, Brusgaard K, Gram LF, Skjodt K. CYP2D6 genotype determination in the Danish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994;47(3):221-5.
10. Cai WM, Chen B, Zhou Y, Zhang YD. Fluoxetine impairs the CYP2D6-mediated metabolism of propafenone enantiomers in healthy Chinese volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1999 Nov;66(5):516-21.



11. Cervantes Peredo A, López López M, Sandoval H, Del Muro R. ¿Farmacia, Farmacogenética, Farmacogenómica? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2001;32(4):11-19.
12. Chen S, Chou WH, Blouin RA, Mao Z, Humphries LL, Meek QC, Neill JR, Martin WL, Hays LR, Wedlund PJ. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther.* 1996 Nov;60(5):522-34.
13. Chida M, Ariyoshi N, Yokoi T, Nemoto N, Inaba M, Kinoshita M, Kamataki T. New allelic arrangement CYP2D6\*36 x 2 found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics.* 2002 Nov;12(8):659-62.
14. Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis, *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:516-520.
15. Dalen P, Dahl ML, Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther.* 1998 Apr;63(4):444-52.
16. Daly AK, Cholerton S, Armstrong M, Idle JR. Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect.* 1994 Nov;102 Suppl 9:55-61.
17. Daly AK, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics.* 1996 Jun;6(3):193-201.
18. Destenaves B, Thomas F. New advances in pharmacogenomics *Curr Op Chem Biol* 2000 ;4:440-444.
19. Eichelbaum M, Mineshita S, Ohnhaus EE, Zekorn C. The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol.* 1986 Jul;22(1):49-53.
20. Eichelbaum M, Gross AS. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism—clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 1990;46(3):377-94.
21. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2: 9-39.

22. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):487-91.
23. Hoehe MR, Timmermann B, Lehrach H. Human inter-individual DNA sequence variation in candidate genes, drug targets, the importance of haplotypes and pharmacogenomics. *Curr Pharm Biotechnol*. 2003 Dec;4(6):351-78.
24. Housman D, Ledley FD. Why pharmacogenomics? Why now? *Nat Biotechnol* 1988;16:492-493.
25. Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. 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*. 1991 May;48(5):943-50.
26. Gan SH, Ismail R, Wan Adnan WA, Wan Z. Correlation of tramadol pharmacokinetics and CYP2D6\*10 genotype in Malaysians subjects, *J of Pharm & Biom Anal* 2002; 30:189-195.
27. Garte S, Crosti F. A nomenclature system for metabolic gene polymorphisms. *IARC Sci Publ*. 1999;(148):5-12.
28. Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects, *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:346:352.
29. Gonzalez FJ, Meyer UA. Molecular genetics of the debrisoquin-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*. 1991 Sep;50(3):233-8.
30. Goodman KW. Ethics, genomics and information retrieval *Comput Biol Med* 1996;26:223-229.
31. Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Persson I, Yue QY, Dahl ML, Bertilsson L, Sjoqvist F. Genetic polymorphism of cytochromes P450: interethnic differences and relationship to incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics*. 1992 Dec;2(6):264-71.
32. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Aug;20(8):342-9.
33. Ingelman\_Sundberg M. Implications of Polymorphic cytochrome P450- dependent drug metabolism for drug development, *Drug Metabolism & Disp*, 2001; 29 (4): 570-573.
34. Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Unraveling the functional genomics of the human CYP2D6 gene locus, *Pharmacogenetics*, 2001; 11: 553-554.

35. Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultra rapid metabolism of debrisoquine, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1993; 90: 11825-11829.
36. Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation, *Mol Pharmacol*, 1994; 46: 452-459.
37. Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine, *J of Biol Chem*, 1990; 265 (28): 17209-17214.
38. Kallio J, Lindberg R, Huupponen R, Iisalo E. Debrisoquine oxidation in a Finnish population: the effect of oral contraceptives on the metabolic ratio. *Br J Clin Pharmacol*. 1988 Dec;26(6):791-5.
39. Kashuba AD, Nafziger AN, Kearns GL, Leeder JS, Shirey CS, Gotschall R, Gaedigk A, Bertino JS Jr. Quantification of intraindividual variability and the influence of menstrual cycle phase on CYP2D6 activity as measured by dextromethorphan phenotyping. *Pharmacogenetics*. 1998 Oct;8(5):403-10.
40. Kelsey KT, Wrensch M, Zuo ZF, Miike R, Wiencke JK. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. *Pharmacogenetics*. 1997 Dec;7(6):463-8.
41. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. 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*. 1989 Dec;45(6):889-904.
42. Klassen C, Watkins III J. *Manual de toxicología*, 5ª ed. Mc Graw Hill Interamericana editores SA de CV México 1999.
43. Kohler D, Hartter S, Fuchs K, Sieghart W, Hiemke C. CYP2D6 genotype and phenotyping by determination of dextromethorphan and metabolites in serum of healthy controls and of patients under psychotropic medication. *Pharmacogenetics*. 1997 Dec;7(6):453-61.
44. Kortunay S, Bozkurt A, Bathum L, Basci NE, Calguneri M, Brosen K, Kayaalp SO. CYP2D6 polymorphism in systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999 Mar;55(1):21-5.

45. Kroemer HK, Eichelbaum M. "It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci.* 1995;56(26):2285-98.
46. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients, *JAMA* 1998;279:1200:1205.
47. Linder MW, Prough RA, Valdes R Jr. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem.* 1997 Feb;43(2):254-66.
48. Lennard MS, Tucker GT, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Woods HF. Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquin metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 1983 Dec;34(6):732-7.
49. Lennard MS. Genetic polymorphism of sparteine/debrisoquine oxidation: a reappraisal. *Pharmacol Toxicol.* 1990 Oct;67(4):273-83.
50. Lou YC. Differences in drug metabolism polymorphism between Orientals and Caucasians. *Drug Metab Rev.* 1990;22(5):451-75.
51. Lovlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultra rapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene, *FEBS Letters* 1996; 392: 30-34.
52. Lovlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM. Polymorphisms in CYP2D6 duplication negative individuals with the ultra rapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6\*35 allele in the ultra rapid metabolism?, *Pharmacogenetics* 2001; 11: 45-55.
53. Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanism for duplication and multi duplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes, *Gene* 1999; 226: 327-338.
54. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet.* 1977 Sep 17;2(8038):584-6.
55. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution, *Pharmacogenetics* 1997; 7: 193-202.
56. Marshall A. Getting the right drug to the right patient, *Nat Biotechnol* 1977;15(12):1249-1252.

57. Masimirembwa CM, Johansson I, Hasler JA, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2D6 in Zimbabwean population, *Pharmacogenetics* 1993; 3: 275-280.
58. Matsunaga I, Ueda A, Sumimoto T, Ichihara K, Ayata M, Ogura H. Site-Directed Mutagenesis of the Putative Distal Helix of Peroxygenase Cytochrome P450, *Archiv Biochem and Biophys* 2001;394:45-53.
59. Matsunaga I, Yamada A, Lee DS, Obayashi E, Fujiwara N, Kobayashi K, Ogura H, Shiro Y.. Enzymatic reaction of hydrogen peroxide-dependent Peroxygenase Cytochrome P450s: Kinetic deuterium isotope effects and analyses by Resonance Raman Spectroscopy, *Biochemistry* 2002; 41:1886-1892.
60. May DG. Genetic differences in drug disposition. *J Clin Pharmacol.* 1994 Sep;34(9):881-97.
61. McCarthy LC, Davies KJ, Campbell DA. Pharmacogenetics in diverse ethnic populations--implications for drug discovery and development. *Pharmacogenomics.* 2002 Jul;3(4):493-506.
62. McElroy S, Sachse C, Brockmoller J, Richmond J, Lira M, Friedman D, Roots I, Silber BM, Milos PM. CYP2D6 Genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. *AAPS Pharmsci* 2000; 2 (4): 1-11.
63. McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 of gene duplication in Saudi Arabians, *Pharmacogenetics* 1997; 7: 187-191.
64. Mendoza R, et al. CYP2D6 polymorphism in Mexican American population, *Clin Pharm & Ther* 2001; 70: 552-560.
65. Meyer UA, Skoda RC, Zanger UM. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-molecular mechanisms. *Pharmacol Ther.* 1990;46(2):297-308.
66. Muralidharan G, Hawes EM, McKay G, Korchinski ED, Midha KK. Quinidine but not quinine inhibits in man the oxidative metabolic routes of methoxyphenamine which involve debrisoquine 4-hydroxylase. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41(5):471-4.
67. Murray M, Reidy GF. Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacol Rev.* 1990 Jun;42(2):85-101.

68. Naranjo CA, Sproule BA, Knoke DM. Metabolic interactions of central nervous system medications and selective serotonin reuptake inhibitors. *Int Clin Psychopharmacol.* 1999 May;14 Suppl 2:S35-47.
69. Nebert DW. Polymorphism in drug-metabolizing enzymes: what is the clinical significance and why do they exist?, *Am J Hum Genet* 1997;60:265-271.
70. Nebert DW, Dieter MZ. The evolution of drug metabolism, *Pharmacology* 2000; 61: 124-135.
71. Nebert DW, Menon AG. Pharmacogenomics, ethnicity, and susceptibility genes. *Pharmacogenomics J.* 2001;1(1):19-22.
72. Ozdemir V, Naranjo CA, Herrmann N, Reed K, Sellers EM, Kalow W. Paroxetine potentiates the central nervous system side effects of perphenazine: contribution of cytochrome P4502D6 inhibition in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Sep;62(3):334-47.
73. Panduro A. *Biología molecular en la clínica.* Mc Graw Hill Interamericana. 2000: 23-54
74. Pang T. Impact of pharmacogenomics on neglected diseases of the developing world. *Am J Pharmacogenomics.* 2003;3(6):393-8
75. Park K. Cytochrome P450 enzymes in the heart, *The Lancet* 2000; 355: 954-946.
76. Preskorn SH. Reducing the risk of drug-drug interactions: a goal of rational drug development. *J Clin Psychiatry.* 1996;57 Suppl 1:3-6.
77. Prody CA, Dreyfus P, Zamir R, Zakut H, Soreq H. De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(2):690-4.
78. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, Eschenhagen T. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment, *Pharmacogenetics* 2002; 12: 465-472.
79. Roden DM, George AL Jr. The genetic basis of variability in drug responses, *Nature,* 2002; 1: 37-44.
80. Roh HK, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Cha YN, Bertilsson L. Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation phenotypes and genotypes in a Korean population, *Pharmacogenetics* 1996;6: 441-447.
81. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences, *Am J Hum Genet* 1997; 60: 284-295.

82. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.
83. Schur BC, Bjerke J, Nuwayhid N, Wong SH. Genotyping of cytochrome P450 2D6\*3 and \*4 mutations using conventional PCR, Clin Chim Acta, 2001; 308: 25-31.
84. Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs, Proc. Natl. Acad. Sci 1988; 85: 5240-5243.
85. Smith CA, Gough AC, Leigh PN, Summers BA, Harding AE, Maraganore DM, Sturman SG, Schapira AH, Williams AC, et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. Lancet. 1992 Jun 6;339(8806):1375-7.
86. Somer M, Kallio J, Pesonen U, Pyykko K, Huupponen R, Scheinin M. Influence of hydroxychloroquine on the bioavailability of oral metoprolol. Br J Clin Pharmacol. 2000 Jun;49(6):549-54.
87. Stanford BJ, Stanford SC. Postoperative delirium indicating an adverse drug interaction involving the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine? J Psychopharmacol. 1999;13(3):313-7.
88. Steijns LS, Van Der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR- based detection of CYP2D6 gene duplication, Clinical Chemistry 1998; 44: 914-917.
89. Tateishi T, Chida M, Ariyoshi N, Mizorogi Y, Kamataki T, Kobayashi S. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. Clin Pharmacol Ther. 1999 May;65(5):570-5.
90. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. Clin Pharmacol Ther. 1997 Oct;62(4):400-7.
91. Wallace RW. Pharmacogenomics: the next logical step, Drug Discovery Today 1999;4:105-107.
92. Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. Molecular basis of genetic variation in debrisoquine hydroxylation in Chinese subjects: Polymorphisms in RFLP and DNA sequence of CYP2D6, Clin Pharmacol Ther 1993;53:410-418.
93. Weber WW. Pharmacogenetics. Oxford University Press. New York. 1997
94. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):529-37.

95. Wolf CR, Smith G. Cytochrome P450 CYP2D6. IARC Sci Publ. 1999a;(148):209-29.
96. Wolf CR, Smith G. Pharmacogenetics. Br Med Bull. 1999b;55(2):366-86.
97. Wolf CR, Smith G, Smith RL.. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. BMJ. 2000;320(7240):987-90.
98. Yokota H, Tamura S, Furuya H, Kimura S, Watanabe M, Kanazawa I, Kondo I, Gonzalez FJ. Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism, Pharmacogenetics, 1993;3:256-263.
99. Yue QY, Svensson JO, Alm C, Sjoqvist F, Sawe J. Interindividual and interethnic differences in the demethylation and glucuronidation of codeine. Br J Clin Pharmacol. 1989 Dec;28(6):629-37.
100. Zanger U, et al. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6, Pharmacogenetics, 2001; 11: 573-585.

#### **Referencias electrónicas.**

- <http://www.imm.ki.se/cypalleles/>
- [www.mogensgallardo.com/](http://www.mogensgallardo.com/)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>



## XI. GLOSARIO

**Alelo.** Forma alternativa de un gen situado en un *locus* particular en un par de cromosomas homólogos.

**Codón.** Triplete de bases de mRNA que codifica un aminoácido.

**Conversión génica.** Fenómeno génico que aún no se comprende por completo; sin embargo puede decirse que es un mecanismo recombinacional no recíproco, donde un gen sirve de molde para corregir mutaciones en otro. Si bien parece ser cierto que este fenómeno ocurre por recombinación, el producto recíproco del *crossing over* no se ha detectado; en otras palabras, al parecer el número de genes relacionados permanece consante, pero su diversidad disminuye.

**Crossing over.** Véase Recombinación.

**DNA.** Ácido desoxiribonucleico.

**Dominante.** Se dice de los genes que se expresan igual en estado homocigoto o heterocigoto.

**Duplicación.** Presencia de genes repetidos en un cromosoma por la adición de un fragmento de un cromosoma homólogo.

**Duplicación génica.** Constituye uno de los mecanismos evolutivos. Postula la presencia de dos genes iguales en el mismo cromosoma, resultantes de un entrecruzamiento desigual.

**Droga.** Sustancia que tiene actividad comprobada y/o que actúa sobre el sistema nervioso central. Algunas veces se utiliza como sinónimo de fármaco.

**Enzimas de restricción.** Nucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas de nucleótidos en el DNA. Se obtienen de una gran variedad de microorganismos, por ejemplo de *E coli*. Se utilizan en la construcción de moléculas de DNA recombinante.

**Fármaco.** Compuesto químico, natural o sintético con actividad biológica selectiva que tiene un perfil establecido probado *in vivo* e *in vitro*.

**Farmacogenética.** Área de la genética bioquímica relacionada con la respuesta a medicamentos y sus variaciones genéticamente determinadas.

**Fenotipo.** Expresión bioquímica o clínica del genotipo.

**Flujo génico.** Difusión gradual de genes de una población a otra.

**Gen.** Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un *locus* determinado en los cromosomas.

**Genotipo.** En sentido restringido, la constitución génica de un *locus* particular; en

sentido amplio se usa como sinónimo de genoma.

**Heterocigoto.** Par de alelos diferentes para un *locus* dado.

**Homocigoto.** Par de alelos iguales para un *locus* dado.

**Iniciador (primer).** Secuencia pequeña de RNA o DNA necesaria para el funcionamiento de la polimerasa.

**Isoenzimas.** Enzimas que pueden diferenciarse por alguna propiedad, pero que actúan sobre el mismo sustrato.

**Kilobase (kb).** Unidad compuesta por mil nucleótidos.

**Locí.** Plural de *locus*.

**Locus.** Lugar de un gen en un cromosoma dado.

**Mutación.** Cambio de la secuencia de bases nitrogenadas en la molécula de DNA.

Variación espontánea o inducida en el genoma.

**Mutación puntual.** Reemplazamiento de una base por otra en el DNA.

**Palíndrome.** Secuencia de DNA en espejo; su lectura es igual en ambos sentidos en dirección 5' a 3', por ejemplo 5' GAATTC 3', 3' CCTTAAG 5'; esto ocurre a menudo en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.

**Polimorfismo genético.** Presencia de dos o más alelos de cualquier sistema en una población en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

**Recesivo.** Se dice de los genes que solo se expresan en estado homocigoto.

**Recombinación (cross over).** Intercambio de material génico entre cromosomas homólogos o entre cromátides hermanas.

**Simpaticolítico.** Fármaco que interfiere con el sistema simpático. Actúa de dos maneras: a) Inhibe la liberación de catecolaminas en la terminación adrenérgica a nivel presináptico y b) Bloquea los receptores adrenérgicos en las células efectoras a nivel postsináptico.

**Seudogén.** Gen incapaz de generar un producto polipeptídico funcional. Secuencias defectuosas de DNA relacionadas con un gen normal; pueden ser de dos clases: las que conservan los intrones y las que pierden estas regiones.

**Tipo silvestre.** Se refiere al alelo normal.

**Xenobiótico.** Sustancia que el organismo no produce; puede ser fármaco, aditivo, insecticida, contaminante.