
**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS
DE CITOCROMO CYP2D6 EN LA POBLACIÓN DE LA REGIÓN
CENTROCCIDENTAL DE VENEZUELA**

**Characterization Of Cytochrome Cyp2d6 Allele Variants In The
Population Of The Central-Western Region Of Venezuela**

PEDRO GRIMÁN¹, B.Sc.; YEINMY MORÁN¹, B.Sc.;
MARÍA CAMARGO¹, TSU; MIGUEL ANGEL CHIURILLO¹, Ph.D.
¹Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay”.
Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental
Lisandro Alvarado (UCLA). Barquisimeto. Venezuela.
Correspondencia: Miguel Angel Chiurillo. Laboratorio de Genética
Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay”. Decanato de Ciencias de la Salud.
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Barquisimeto.
Avenida Libertador. 3001. Estado Lara. Venezuela.
Fax: (58) 251 259 18 86. E-mail: mchiurillo@ucla.edu.ve

Presentado 17 de diciembre de 2008, aceptado 15 de enero de 2009, correcciones 19 de febrero de 2009

RESUMEN

El gen CYP2D6 codifica para una monooxigenasa perteneciente al citocromo P450, la cual está involucrada en la biotransformación de un gran número de drogas comúnmente prescritas, como antidepresivos, antineoplásicos y antihipertensivos. Algunos efectos adversos, así como falla terapéutica pueden ser relacionados con la actividad anormal de CYP2D6 producto de polimorfismos en el gen de dicha enzima. Con el fin de predecir la frecuencia de algunos fenotipos metabolizadores pobres de CYP2D6 en la población de la región centroccidental de Venezuela se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes alélicas CYP2D6*3, *4 y *6. Se extrajo ADN genómico a partir de sangre periférica de 100 individuos voluntarios aparentemente sanos, y se procedió a la genotipificación por PCR tetra-*primer* alelo-específica y análisis por electroforesis en geles de agarosa. Se compararon las frecuencias obtenidas con poblaciones de otros países. El alelo más frecuente fue CYP2D6*4 con 16,5%, mostrando una diferencia significativa con la reportada con poblaciones asiáticas. Este trabajo constituye un estudio preliminar en la caracterización de un grupo más amplio de alelos de CYP2D6 con el fin de asistir al desarrollo de una farmacoterapia individualizada en nuestro país.

Palabras clave: Citocromo P450, CYP2D6, Farmacogenética.

ABSTRACT

The CYP2D6 gene encodes for a monooxygenase belonging to the cytochrome P450, which is involved in the biotransformation of a large number of commonly prescribed drugs such as antidepressants, antihypertensive and antineoplastic. Some side effects, as well as therapeutic failure may be related to abnormal activity of CYP2D6 product of polymorphisms in the CYP2D6 gene. In order to predict the frequency of some poor metabolisers phenotypes of CYP2D6 in the population of the Central-Western region of Venezuela it was determined the allelic and genotypic frequencies of CYP2D6 *3, *4, *6 allelic variants. DNA was extracted from peripheral blood of 100 apparently healthy volunteers, and proceeded to genotyping by PCR tetra-primer allele-specific analysis and agarose gel electrophoresis. We compared the frequencies obtained with those of other countries. The most frequent allele was CYP2D6 *4 with 16.5%, showing a significant difference to the reported in Asian populations. This work is a preliminary study on the characterization of a wider group of CYP2D6 alleles in order to assist the development of an individualized pharmacotherapy in our country.

Key words: cytochrome P450, CYP2D6, Pharmacogenetic.

INTRODUCCIÓN

CYP2D6 es una monooxigenasa miembro de la superfamilia de citocromo P450, involucrada en el metabolismo de una amplia gama de fármacos de utilidad clínica, como neurolépticos, antidepresivos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y β -bloqueantes, así como de ciertas sustancias endógenas (Ingelman-Sundberg, 2005).

El gen que codifica para CYP2D6 está localizado cerca de dos pseudogenes alineados en tándem, CYP2D8P y CYP2D7P, en el cromosoma 22q13.1 (Ledesma y Agundez, 2005). Esta región del genoma es altamente polimórfica y se han descrito alrededor de 70 variantes alélicas, las cuales en su mayoría llevan a un cambio en la actividad enzimática (www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm), siendo esto una de las principales causas de las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos que son metabolizados por este citocromo.

Los individuos pueden ser clasificados según la actividad enzimática de CYP2D6, la cual puede presentar cuatro fenotipos: metabolizadores pobres (MP) cuando la actividad enzimática es nula, metabolizadores ultrarápidos cuando la actividad enzimática está incrementada debido a la existencia de múltiples copias del gen. Se consideran como metabolizadores extensivos a individuos con actividad normal y como metabolizadores intermedios aquellos que tienen actividad enzimática disminuida (Crescenti *et al.*, 2007). Se han relacionado alrededor de 20 polimorfismos con el fenotipo MP (Zanger *et al.*, 2004), de los cuales aproximadamente el 95% corresponden a los alelos *3, *4, *5 y *6, en individuos caucásicos (Sachse *et al.*, 1997), siendo el alelo con mayor frecuencia el *4, caracterizado por una sustitución de base G1934A en el sitio de *splicing* entre el intrón tres y el exón cuatro, produciendo un cambio en el marco de lectura resultando de esta mutación una proteína truncada (Hanioka *et al.*, 1990). La variante *3 consiste en una delección de una base 2549A que también produce un cambio

en el marco de lectura (Kagimoto *et al.*, 1990), el alelo *5 es causada por la delección completa del gen, y la variante *6 corresponde a una delección de una base T1707 en el exón tres, originando un cambio en el marco de lectura y la generación de un codón de parada después de la delección (Saxena *et al.*, 1994).

En este trabajo se investigaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos *3, *4 y *6 de 100 individuos sanos con el fin de predecir fenotipos MP en una muestra de la población de la región centroccidental de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

El estudio incluyó 100 individuos aparentemente sanos no relacionados (39 hombres y 61 mujeres) con un promedio de edad de 21,5 años (16-40 años) procedentes de los estados de la región centroccidental de Venezuela: Estados Lara, Portuguesa o Yaracuy. El estudio reunió los requerimientos éticos del comité del Decanato de Ciencias de la Salud-UCLA, y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. A cada uno de los individuos, con las características mencionadas, se le tomó aproximadamente 5 mL de sangre periférica, la cual fue colectada en vacutainers que contenían EDTA como anticoagulante.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción se realizó a partir de 300 µL de sangre periférica mediante el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). La concentración del ADN de las muestras fue estimada por espectrofotometría a 260/280 nm de longitud de onda empleando un equipo GeneQuant pro (Amersham-Pharmacia).

DETERMINACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS

La detección de los alelos se hizo por PCR tetra-*primer* empleando los iniciadores reportados por Hersberger *et al.*, 2000 (Tabla 1).

| Iniciador | *Posicion 5' | Secuencia | *Posicion 3' |
|-----------|--------------|--------------------------|--------------|
| 1new | 1388 | TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCG | 1409 |
| 2new | 2137 | GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT | 2114 |
| 3 | 2098 | GCGGAGCGAGAGACCGAGGA | 2117 |
| 4new | 3203 | GGTCCGGCCCTGACACTCCTTCT | 3181 |
| 6 | 2624 | GCTAACTGAGCACG | 2637 |
| 7 | 1947 | CGAAAGGGGCGTCC | 1934 |
| 11 | 1808 | TCCTCGGTCACCCA | 1795 |
| Awt | 2650 | TCCCAGGTCATCCT | 2637 |
| Bmut | 1921 | TCTCCCACCCCAA | 1934 |
| Tmut | 1782 | GTCGCTGGAGCAGG | 1795 |

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio para las reacciones de PCR tetra-*primer*. *Posición con respecto a la secuencia del gen CYP2D6 humano (GenBank N° de acceso M33388). La secuencia de los *primers* se muestran de 5' → 3'.

Los iniciadores se usaron a una concentración inicial de 10 μ M. A un volumen final de 25 μ L para las reacciones de PCR, se les agregó 5 μ L de buffer 5X, 0,25 μ L de *GoTaq flexi DNA Polimerase* (Promega; 5u/ μ L), 1,5 μ L de cloruro de magnesio (25 mM) y 1 μ L de mezcla dNTPs.

Para la detección del alelo *3, la mezcla de la reacción de tetra-*primer* PCR estaba compuesta por 0,3 μ L de *primer 3*, 0,3 μ L de *primer 4new*, 0,75 μ L de *primer 6*, 0,75 μ L de *primer awt*. Las condiciones de amplificación usadas fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30 s, 72 °C por 60 s; y luego 27 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 60 s.

Para la detección del alelo *4, la mezcla de la reacción de tetra-*primer* fue 0,5 μ L de *primer 1new*, 0,5 μ L de *primer 2new*, 0,75 μ L de *primer Bmut* y 0,5 μ L de *primer 7*. Las condiciones usadas para la amplificación fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 15 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 60 s; y posteriormente 27 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 60 s.

Para la detección del alelo *6, la mezcla de la reacción de tetra-*primer* PCR estaba compuesta por 0,5 μ L de *primer 1new*, 0,5 μ L de *primer 2new*, 0,75 de *primer Tmut*, 0,75 μ L de *primer 11*. Las condiciones de la PCR fueron: 2 minutos a 95 °C, seguido de 15 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30 s, 72 °C por 60 s; y luego por 27 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 60 s.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa a 3% teñido con bromuro de etidio para ser visualizado empleando Kodak Gel Logic 200 Imagen System (Fig. 1).

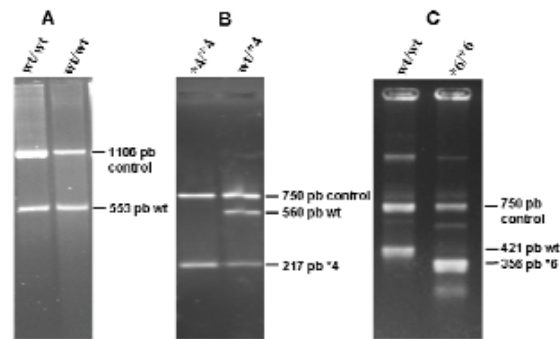


Figura 1. Análisis de los alelos CYP2D6*3, *4 y *6. Se muestran imágenes de electroforesis en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio realizadas para la detección de los alelos *3 (A), *4 (B) y *6 (C). Se indica el fragmento de control interno de las PCRs, las bandas para el alelo normal o wt (*wild type*) para cada variante estudiada, y las bandas producidas por la presencia de los alelos *4 y *6 detectadas en este trabajo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las frecuencias alélicas entre las poblaciones comparadas mediante el paquete estadístico SSPS 11.0. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En este estudio se investigó las frecuencias alélicas de las variantes MP CYP2D6*3, *4 y *6 en 100 individuos voluntarios procedentes de la región centroccidental de Venezuela. La variante alélica que se presentó con mayor frecuencia fue el alelo *4 (16,5%), siendo en el 1% de los casos homocigotos. La frecuencia encontrada del alelo *6 fue 1%, mientras que el alelo *3 no se detectó en los sujetos del estudio (Tablas 2 y 3).

| Alelo | Frecuencia (%) |
|-------|----------------|
| *3 | 0,0 |
| *4 | 16,5 |
| *6 | 0,5 |

Tabla 2. Frecuencia de los alelos de CYP2D6 estudiados.

La distribución de las frecuencias alélicas de CYP2D6*3, *4 y *6 obtenidas en este trabajo fueron tomadas como referencia para ser comparadas con diferentes poblaciones empleando el test χ^2 (Tabla 4). Se encontraron diferencias significativas al comparar con las frecuencias de CYP2D6*4 reportadas para poblaciones del Sur de la India ($p < 0,05$) y China ($p < 0,001$), no así para poblaciones de Europa y América.

| Genotipo | n | Frecuencia (%) |
|----------|----|----------------|
| wt/*3 | 0 | 0 |
| *3/*3 | 0 | 0 |
| wt/*4 | 29 | 29 |
| *4/*4 | 2 | 2 |
| wt/*6 | 0 | 0 |
| *6/*6 | 1 | 1 |

Tabla 3. Frecuencia de los genotipos de CYP2D6 en los individuos estudiados. n: número del genotipo correspondiente, N: 100, wt: wild-type.

No se evidenciaron diferencias significativas con las frecuencias de los alelos *3 y *6 en las poblaciones usadas para comparación.

| Población | n | Frecuencia (%) | | | Referencia |
|-------------------------------------|-----|----------------|-------|-----|---------------------------------|
| | | *3 | *4 | *6 | |
| Región Centroccidental de Venezuela | 100 | 0,0 | 16,5 | 0,5 | Este trabajo |
| Colombia | 121 | 1,2 | 19,4 | - | Isaza <i>et al.</i> , 2000 |
| México | 243 | 1,4 | 11,2 | - | López <i>et al.</i> , 2005 |
| Holanda | 589 | 2,0 | 20,7 | 0,9 | Sache <i>et al.</i> , 1997 |
| Rusia | 290 | 1,0 | 24,4 | 0,9 | Gaikovitch <i>et al.</i> , 2003 |
| Italia | 360 | 0,7 | 15,3 | 1,3 | Scordo <i>et al.</i> , 2004 |
| Francia | 514 | 1,6 | 18,6 | 0,9 | Sabbagh <i>et al.</i> , 1999 |
| España | 105 | 1,0 | 13,8 | 1,0 | Menoyo <i>et al.</i> , 2006 |
| España | 290 | 0,9 | 16,5 | 0,7 | Crescenti <i>et al.</i> , 2007 |
| Sur de la India | 447 | 0,0 | 7,3* | - | Theophilus <i>et al.</i> , 2006 |
| China | 223 | - | 0,2** | - | Ji <i>et al.</i> , 2002 |

Tabla 4. Frecuencias alélicas de variantes de CYP2D6 (*3, *4, *6) en diferentes poblaciones. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

Es esencial determinar la prevalencia de polimorfismos de CYP2D6 en cada población, debido a que las frecuencias de las variantes alélicas son diferentes en cada grupo étnico, aunque el efecto de cada variante alélica sea idéntico para cada población (Leathart *et al.*, 1998). Aún cuando han sido reportados más de 20 polimorfismos de CYP2D6 causantes del fenotipo MP, la mayoría ocurren de manera infrecuente y no resultan de relevancia práctica (Zanger *et al.*, 2004).

En este trabajo se reportan la detección de tres de estos alelos MP (*3, *4 y *6) mediante ensayo de PCR tetra-*primer* en la población de la región centroccidental de Venezuela. La mutación causante de fenotipo MP más frecuente fue *4. Las frecuencias de estos alelos fueron encontradas semejantes a aquellas reportadas para diferentes poblaciones europeas (Sachse *et al.*, 1997; Sabbagh *et al.*, 1999; Gaikovitch *et al.*, 2003; Scordo *et al.*, 2004; Menoyo *et al.*, 2006; Crescenti *et al.*, 2007), así como en poblaciones latinoamericanas de Colombia y México (Isaza *et al.*, 2000; López *et al.*, 2005). Mientras que para poblaciones europeas las frecuencias para este alelo están entre 15%-21%, en Colombia en 19,4% y en México 11,21%, en el presente estudio, la frecuencia de CYP2D6*4 fue encontrada en 16,5%, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas.

En contraste, las poblaciones asiáticas consideradas en este trabajo presentan frecuencias menores de *4 que resultan en diferencias significativas (Ji *et al.*, 2002; Theophilus *et al.*, 2006). Los asiáticos y otros pobladores de las islas del pacífico tienen una alta frecuencia del alelo MP CYP2D6*10 (Bradford, 2002). La información de amerindios de Norte, Centro y Sur América indican frecuencias comparativamente menores del alelo *10, debido probablemente a un efecto fundador (Bradford, 2002).

Estimaciones revelan que entre el 20 y 25% de todas las drogas de uso clínico son metabolizadas al menos en parte por CYP2D6 (Evans y Relling, 2004). Esta enzima responde por solo un pequeño porcentaje de todo el metabolismo hepático del citocromo P450, pero su papel en el metabolismo de fármacos es mucho mayor que su contenido relativo (Zanger *et al.*, 2004). Los individuos homocigotos para uno de los alelos MP de CYP2D6 o quienes presentan una combinación de dos alelos MP muestran una actividad disminuida de esta enzima y efectos adversos ante algunas terapias farmacológicas de rutina, en las cuales la eliminación de la droga es dependiente de CYP2D6 (Ingelman-Sundberg, 2005). Cuatro de estos alelos, *3, *4, *5 y *6, causan el 93-97% de los fenotipos MP en la población caucásica (Sachse *et al.*, 1997).

CYP2D6 es crucial en el metabolismo de drogas, por ello existe la necesidad de estudios de farmacogenética con muestras grandes en cada población. Debido a que la población venezolana es fundamentalmente de carácter mixto, aún más se torna relevante la evaluación de las variantes alélicas de varios citocromo P450. La determinación de los alelos MP *3, *4 y *6 de CYP2D6, incluyendo otros que serán analizados en el futuro, facilitará su uso en la práctica clínica asistiendo al desarrollo de una farmacoterapia individualizada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Proyecto 025-ME-2005 CDCHT-UCLA.

BIBLIOGRAFÍA

BRADFORD LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3(2):229-243.

CRESCENTI A, MAS S, GASSÓ S, BAIGET M, BERNARDO M, LAFUENTE A. Simultaneous genotyping of CYP2D6 *3, *4, *5 and *6 polymorphisms in a Spanish population through multiplex long polymerase chain reaction and minisequencing multiplex single base extension analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(10):992-997.

EVANS WE, RELLING MV. Moving towards individualized with pharmacogenetics. *Nature*. 2004;429:464-468.

GAIKOVITCH EA, CASCORBI I, MROZIKIEWICZ PM, BROCKMÖLLER J, FRÖTSCHL R, KÖPKE K, *et al.* Polymorphisms of drug metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and p-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59(4):303-312.

HANIOKA N, KIMURA S, MEYER UA, GONZALEZ FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934—A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet*. 1990;47(6):994-1001.

HERSBERGER M, MARTI-JAUN J, RENTSCH K, HÄNSELEER E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetraprimer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*. 2000;46:1072-1077.

HUMAN CYTOCHROME P450 (CYP) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>.

INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5:6-13.

ISAZA CA, HENAO J, LÓPEZ AM, CACABELOS R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2000;22(9):695-705.

JI L, PAN S, MARTI-JAUN J, HÄNSELER E, RENTSCH K, HERSBERGER M. Single step Assay to Analyze CYP2D6 Gene Polymorphism in Asian: allele frequency and a novel *14b allele in Mainland Chinese. *Clin Chem*. 2002;48(7):938-988.

KAGIMOTO M, HEIM M, KAGIMOTO K, ZEUGIN T, MEYER UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*. 1990;265(28):17209-17214.

LEATHART JB, LONDON SJ, STEWARD A, ADAMS JD, IDLE JR, DALY AK. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*. 1998;8(6):529-541.

LEDESMA MC, AGUNDEZ JA. Identification of Subtypes of CYP2D Gene

Rearrangements among Carriers of CYP2D6 Gene Deletion and Duplication. *Clin Chem*. 2005;51(6):939-943.

LÓPEZ M, GUERRERO J, JUNG-COOK H, ALONSO ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(10):749-754.

MENOYO A, DEL RIO E, BAIGET M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*. 2006;24(5):381-385.

SABBAGH N, BRICE A, MAREZ D, DÜRR A, LEGRAND M, LO GUIDICE JM, *et al*. CYP2D6 polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Mov Disord*. 1999;14(2):230-236.

SACHSE C, BROCKMÖLLER J, BAUER S, ROOTS I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997;60(2):284-295.

SAXENA R, SHAW GL, RELLING MV, FRAME JN, MOIR DT, EVANS WE, *et al*. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*. 1994;3(6):923-926.

SCORDO MG, CAPUTI AP, D'ARRIGO C, FAVAA G, SPINA E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res*. 2004;50:195-200.

THEOPHILUS N, CHANDRASEKARAN A, SAM S, GERARD N, RAJAGOPAL K. CYP2D6 Genetic polymorphism in South Indian Population. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(8):1655-1658.

ZANGER UM, RAIMUNDO S, EICHELBAUM M. Cytochrome P450 2D6: Overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(1):23-37.