

T 338

AH00406
83247



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**“Polimorfismo del gen *CYP2D6* en pacientes con enfermedad de Huntington
y su relevancia en la respuesta a la farmacoterapia”**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL RAMÍREZ RIOJA

MATRÍCULA: 201180978

COMITÉ TUTORIAL:

TUTOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

ASESOR: DRA. GILDA FLORES ROSALES

ASESOR: DRA. ELISA ALONSO VILATELA

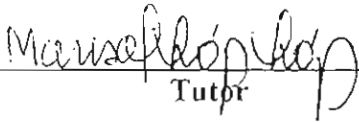


MÉXICO, D.F.


NOVIEMBRE, 2003

Vo. Bo.
Comité Tutorial


Dra. Marisol López López


Tutor

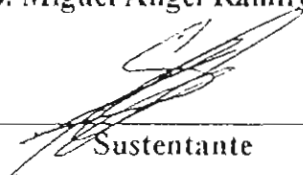
Dra. Gilda Flores Rosales


Asesor

Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela


Asesor

QFB. Miguel Angel Ramírez Rioja


Sustentante

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA

Presidente: Dra. Teresa Corona Vázquez

Vocal: Dra. Helgi Jung Cook

Secretaria: Dra. Marisol López López

Comisión de la Maestría: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Trabajo apoyado por CONACYT
Proyecto No. 37103M

La realización de este trabajo se llevó a cabo en el
Departamento de Neurogenética y Biología Molecular
del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

MIRAGE

Capítulo	Índice General	Página
1.	Resumen	1
2.	Marco Teórico	3
2.1.	Farmacogenética.....	3
2.2.	Farmacogenómica.....	3
2.3.	Metabolismo de Fármacos.....	4
2.3.1.	Fase farmacocinética.....	5
2.3.2.	Enzimas Metabolizadoras de Fármacos (EMF).....	7
2.3.3.	Citocromos P450.....	8
2.3.4.	Funciones que cumplen las enzimas citocromo P450.....	9
2.3.5.	Mecanismos de acción.....	11
2.3.6.	Inducción de las enzimas citocromo P450.....	12
2.3.7.	Reacciones de fase I.....	14
2.3.8.	Reacciones de fase II.....	15
2.3.9.	Biotransformación.....	17
2.3.10.	Biodisponibilidad.....	18
2.3.11.	Excreción.....	21
2.4.	Fase Farmacodinámica.....	22
2.4.1.	Eficacia de los fármacos.....	23
2.5.	Nomenclatura de los citocromos P450.....	24
2.5.1.	Importancia de los citocromos P450.....	25
2.6.	El polimorfismo genético de CYP2D6.....	28
2.7.	Enfermedad de Huntington.....	32
2.8.	Haloperidol.....	33
2.9.	Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio.....	36
2.9.1.	Purificación de DNA.....	36
2.9.2.	Cuantificación de DNA.....	36
2.9.3.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	37
2.9.4.	Enzimas de restricción.....	43
2.9.5.	Separación electroforética de DNA.....	43
3.	Objetivos	45
3.1.	Objetivo general.....	45
3.2.	Objetivos específicos.....	45
4.	Desarrollo Experimental	46
4.1.	Materiales.....	46
4.1.1.	Pacientes.....	46
4.1.2.	Reactivos.....	46
4.1.3.	Equipo.....	46
4.2.	Metodología.....	47
4.2.1.	Obtención de la muestra de sangre periférica.....	47
4.2.2.	Extracción de DNA genómico.....	48
4.2.3.	Cuantificación de DNA genómico.....	49
4.2.4.	Genotipificación de CYP2D6 *3 y *4.....	49
4.2.5.	Electroforesis.....	51

4.2.6.	Análisis de genotipos *3 y *4.....	51
5.	Resultados.....	53
5.1.	Amplificación de DNA.....	53
5.2.	Tipificación del alelo <i>CYP2D6*3</i>	53
5.2.1.	Tipificación del alelo <i>CYP2D6*4</i>	54
5.3.	Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>CYP2D6*3</i> y <i>CYP2D6*4</i> ..	55
6.	Discusión de resultados.....	56
7.	Conclusiones.....	58
8.	Bibliografía.....	59

Vo. Bo. Comité tutorial

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Familias de citocromos P450.....	25
Tabla 2. Algunas enzimas del citocromo P450 con ejemplos de los sustratos más conocidos y los fármacos que los pueden inducir o inhibir...	27
Tabla 3. Frecuencias alélicas.....	30
Tabla 4. Frecuencias genotípicas.....	55
Tabla 5. Análisis comparativo de frecuencias alélicas <i>CYP2D6</i> en diferentes poblaciones.....	55

Índice de Figuras	Página
Figura 1. Ruta metabólica que siguen los fármacos para tener efecto farmacológico.....	5
Figura 2. Estructura simplificada de una enzima citocromo P450.....	8
Figura 3. Modelo de enzima citocromo P450 de una bacteria de nombre <i>Pseudomonas putida</i>	9
Figura 4. Mecanismo de acción del Citocromo P450.....	11
Figura 5. Componentes moleculares del sistema citocromo P450 celular en la membrana del retículo endoplásmico.....	12
Figura 6. Inducción de las enzimas citocromo P450.....	13
Figura 7. Metabolismo de fármacos.....	14
Figura 8. Factores que regulan la expresión de los citocromos P450.....	26
Figura 9. Enzimas del citocromo p450 y su actividad en el metabolismo de fármacos en el mercado.....	28
Figura 10. Localización del gen <i>CYP2D6</i>	29
Figura 11. Localización del gen causante de la enfermedad de Huntington.....	32
Figura 12. Estructura química del haloperidol.....	33
Figura 13. Reacción en cadena de la polimerasa.....	39
Figura 14. Actividad endonucleasa de las <i>ER Taq I</i> y <i>EcoR V</i>	43
Figura 15. Separación electroforética de ácidos nucleicos.....	44
Figura 16. Diagrama que muestra de forma esquemática el proceso de fenotipificación de los alelos <i>CYP2D6 *3 Y *4</i>	47
Figura 17. Secuencia amplificada del alelo <i>CYP2D6*3</i>	50
Figura 18. Secuencia amplificada del alelo <i>CYP2D6*4</i>	51
Figura 19. Genotipos de los alelos *4 y *3.....	52
Figura 20. Gel de poliacrilamida al 15%, con los genotipos encontrados para el alelo <i>CYP2D6*3</i>	53
Figura 21. Gel de poliacrilamida al 8%, con los genotipos encontrados para el alelo <i>CYP2D6*4</i>	54

1. Ergebnis

1. RESUMEN

La farmacoterapia de las enfermedades neuropsiquiátricas ha reducido la morbilidad y ha mejorado la calidad de vida de los pacientes; sin embargo, se ha observado una gran variabilidad individual a la respuesta terapéutica. La mayoría de las diferencias individuales en la respuesta a los fármacos, caracterizadas a escala molecular, se deben a los genes que codifican para las enzimas capaces de metabolizar fármacos y, en menor grado, a los genes que codifican para sus receptores y transportadores. Estas variaciones pueden implicar diferencias individuales en la eficacia terapéutica y/o reacciones adversas al fármaco, las cuales pueden ser severas o incluso letales. Recientemente, la farmacogenómica surgió como una alternativa potencial para la aplicación del conocimiento del genoma humano en la elaboración de tratamientos efectivos y terapias individualizadas que sean más exitosas y menos riesgosas. En el caso de fármacos de alta potencia como los antipsicóticos, dentro de los cuales está el haloperidol, es necesario tener herramientas más sólidas que rompan con los esquemas tradicionales de dosificación, y con la farmacoterapia estándar que no toma en cuenta las variaciones individuales. En este sentido, la farmacogenómica de los padecimientos neurodegenerativos se encuentra en etapas iniciales enfocadas al entendimiento de los mecanismos genéticos responsables de la etiopatogenia de la enfermedad y de la variabilidad terapéutica individual.

Los polimorfismos del gen *CYP2D6* han sido considerados como uno de los factores críticos que causan susceptibilidades individuales diferentes en la respuesta a los fármacos. Este gen se localiza en el cromosoma 22q13.1 y es parte de un grupo que incluye dos o tres pseudogenes relacionados. Los individuos homocigotos para los alelos funcionales presentan un fenotipo EM (metabolizador rápido); en contraste, los PM (metabolizadores lentos) son homocigotos para alguno de los más de 60 alelos mutantes de *CYP2D6*.

En el tratamiento clínico de los pacientes con enfermedad de Huntington (EH) se usan antidepresivos tricíclicos, algunos inhibidores de la recaptura de serotonina y haloperidol, los cuales son metabolizados por la enzima *CYP2D6*. Es frecuente encontrar una gran variabilidad en la respuesta a esta farmacoterapia, la cual puede ser secundaria al genotipo individual para *CYP2D6*.

Es este trabajo se estudiaron 70 pacientes con enfermedad de Huntington mediante un análisis molecular de los alelos *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4. En todos los sujetos se extrajo DNA genómico a partir de sangre periférica y se amplificaron regiones específicas de estos alelos. Los productos de PCR se digirieron con *MvaI* y *MspI*, respectivamente, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa o acrilamida teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

Los resultados mostraron que el alelo tipo silvestre *CYP2D6* *1 tiene una frecuencia de 88%, el alelo *CYP2D6* *3 de 1% y el alelo *CYP2D6* *4 de 11.7%. Los genotipos obtenidos para ambos alelos indican que el fenotipo homocigoto normal o silvestre funcional es el que muestra una mayor frecuencia en la población con EH con un 77%, el heterocigoto *1/*3 tuvo una frecuencia de 0.15%, y el heterocigoto *1/*4 tuvo una frecuencia de 21%. Los genotipos homocigotos mutados *3/*3 y *4/*4 no se encontraron en ningún caso. Se identificó un paciente heterocigoto compuesto *3/*4 que corresponde a un metabolizador pobre, lo cual se confirmó con el resultado del estudio de fenotipo. Es interesante señalar que este dato muestra que existe una buena correlación entre la genotipificación y la medición de las cantidades de fármaco excretadas en orina utilizando dextrometorfán como fármaco de prueba.

21 MARCO TEORICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Farmacogenética

Es el estudio de la variación genética, aplicada a la variabilidad individual, de la respuesta a un fármaco (Mahgoub A, 1977). La farmacogenética está relacionada con la genética y el estudio de la herencia de diferencias biológicas, de generación en generación, y de la diversidad resultante en la población. Además, estudia los diferentes efectos de un fármaco *in-vivo* en pacientes diferentes, dependiendo de la presencia de variantes genéticas heredadas (Mahgoub A, 1977).

Un número de estudios recientes demuestran que las variaciones genéticas contribuyen a respuestas diferentes a un fármaco. Por ejemplo, tenemos los siguientes casos: (i) la respuesta de los pacientes con Alzheimer al tratamiento con tacrina de acuerdo al genotipo de *ApoE*. (Sjogren, 2001), (ii) la respuesta de los pacientes con arterosclerosis a prevastatina de acuerdo con su genotipo *CETP*, (iii) la respuesta de los pacientes asmáticos al albuterol de acuerdo con el receptor adrenérgico beta-2 que presenten, el tratamiento de pacientes asmáticos con inhibidores ALOX 5 y su genotipo *ALOX5* (Drazen, 1999), (iv) el tratamiento con omeprazol para las infecciones por *H. pylori* en pacientes con úlcera de acuerdo al genotipo *CYP2C19* (Sapone, 2003), (v). Los efectos adversos del abacavir en pacientes con SIDA con relación con a los alelos HLA, y a la respuesta al tratamiento con herceptina en relación con la expresión del oncogen Her2 (Hassanhi, 1995).

2.2. Farmacogenómica

La farmacogenómica puede definirse como la aplicación de la tecnología genómica en el desarrollo de fármacos y de esquemas terapéuticos diseñados para lograr ensayos clínicos más exitosos y terapéuticos más efectivos y menos tóxicos (Pickar y Rubinow, 2001) La farmacogenómica incluye no sólo la farmacodinámica, sino también la farmacocinética. Esta nueva ciencia tiene sus raíces en la farmacogenética y en el uso de técnicas moleculares tradicionales para estudiar las diferencias en los genes individuales que codifican para proteínas que participan en las vías metabólicas de los fármacos (Destenaves y Thomas, 2000; Wiczorek y Tsongalis, 2000). El gran reto de la farmacogenómica es descubrir las bases genéticas y los mecanismos moleculares de la enfermedad que permitan definir los mejores blancos terapéuticos posibles y desarrollar fármacos que actúen de forma específica y altamente eficaz sobre ellos.

Una gran parte de los medicamentos utilizados clínicamente pasan por el proceso de biotransformación que tiene lugar en diversos órganos del cuerpo, siendo el hígado uno de los más activos. Éste lleva a cabo este proceso en dos etapas, primero mediante enzimas que transforman las moléculas lipófilas del fármaco en un metabolito más hidrosoluble, que habitualmente representan la forma activa del fármaco. Estos metabolitos posteriormente se metabolizan y se eliminan del organismo. Esta ruta depende de la actividad de los biocatalizadores, los cuales están determinados por características genéticas. Pequeñas diferencias o mutaciones en la dotación genética (polimorfismo) pueden producir modificaciones en las enzimas que codifican (Elliot, 2000).

El estudio farmacogenómico ofrece la posibilidad de identificar los diferentes tipos de respuestas a un determinado fármaco, permitiendo estratificar la población de voluntarios o pacientes en metabolizadores lentos, rápidos y ultrarrápidos. Las ventajas de esta estratificación se traducen en una selección *a priori* de poblaciones homogéneas, en cuanto a la metabolización del fármaco, y de esta manera una mejor evaluación de las respuestas terapéuticas, y de los efectos secundarios o tóxicos del fármaco. De este modo podrían establecerse dosis ideales para cada grupo e incluso excluir aquellos casos en los que el fármaco produce efectos no deseados o no es eficaz (Münker, 2000).

Tanto los sujetos metabolizadores lentos como los ultrarrápidos muestran concentraciones plasmáticas anormales del fármaco y sus metabolitos. Los primeros no son capaces de metabolizar el fármaco y acumulan dosis elevadas que pueden ser tóxicas, mientras que los metabolizadores ultrarrápidos no suelen mostrar respuesta clínica en absoluto debido a su tendencia a eliminar los fármacos del organismo antes de que tengan el efecto terapéutico deseado (Münker, 2000).

2.3. Metabolismo de Fármacos

Los fármacos y otros productos químicos que son extraños al organismo como aditivos alimentarios, productos químicos del medio ambiente, o insecticidas, sufren transformaciones enzimáticas que usualmente desembocan en una pérdida de la actividad farmacológica. Aunque el metabolismo de fármacos conduce a una detoxificación, los procesos de oxidación, reducción, y otras reacciones catalizadas por enzimas pueden llevar a la formación de un metabolito que tenga efectos terapéuticos o tóxicos, a este fenómeno se le denomina bioactivación (Williams, 1978).

Es importante aclarar que los factores farmacológicos juegan un papel importante en la respuesta a los fármacos. La ruta metabólica de los fármacos se puede dividir en dos etapas, la farmacocinética, que estudia como los fármacos se absorben, se distribuyen y llegan a los tejidos blanco, y la farmacodinamia que es la encargada de estudiar el efecto farmacológico, la respuesta clínica y si se desemboca en eficacia o toxicidad. Esto se observa en el siguiente diagrama (Figura 1).

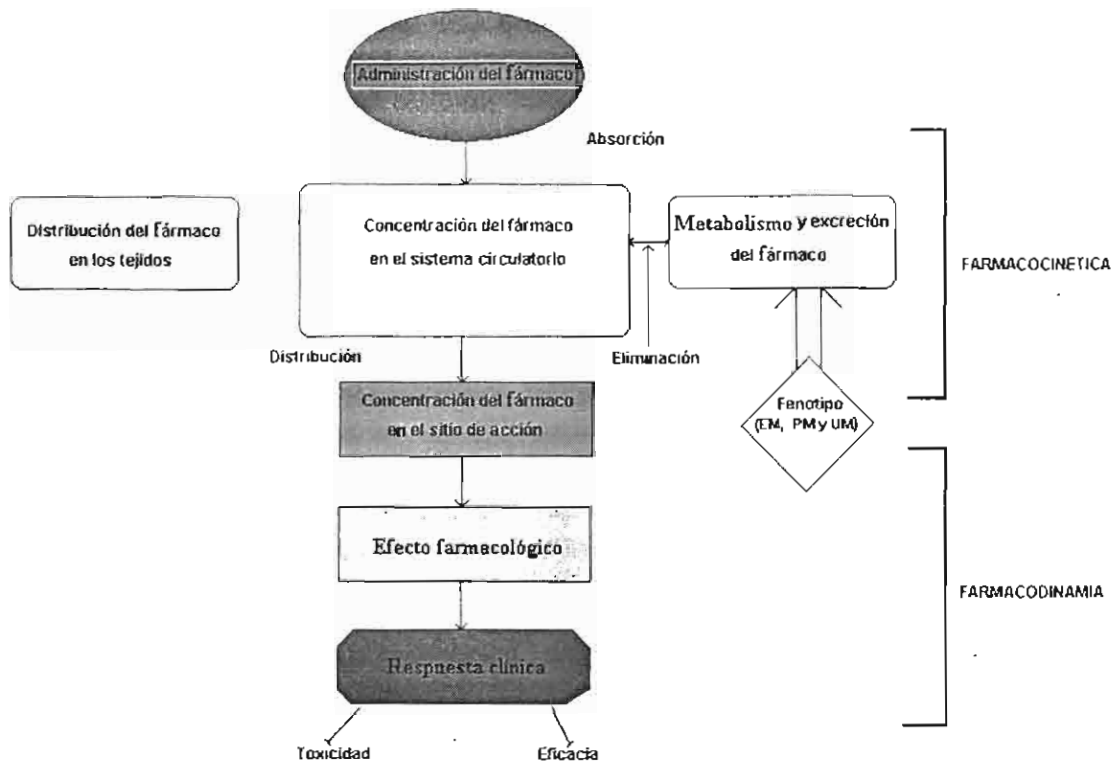


Figura. 1. Ruta metabólica que siguen los fármacos para tener efecto farmacológico. (Tomado de www.dml.georgetown.edu/deptspharmacology/davetab.html. Sep 2002.)

2.3.1. Fase farmacocinética

Farmacología

La farmacología es el estudio que comprende el conocimiento de la historia, el origen, las propiedades físicas y químicas, la presentación, los efectos bioquímicos y fisiológicos, los mecanismos de acción, la absorción, la distribución, la biotransformación y la excreción (eliminación), así como el uso terapéutico de los fármacos. Su estudio tradicionalmente se ha dividido en dos fases: la farmacocinética y la farmacodinamia (Goodman y Gilman, 1996).

La farmacocinética es la ciencia que matemáticamente describe el movimiento y curso temporal de un fármaco, en fases que comprenden absorción, distribución, biotransformación y excreción de un medicamento, con el fin de optimizar la farmacoterapia en términos de seguridad y eficacia. Utiliza varios modelos para explicar el movimiento de una sustancia en el organismo. En el modelo monocompartamental se asume un sólo espacio en el que se establece el equilibrio entre lo que entra y lo que sale. Pero los modelos multicompartamentales, a pesar de su mayor complejidad, son los que más se ajustan a la realidad, pues tiene en cuenta que el medicamento administrado no sólo sufre procesos de absorción y eliminación, sino también el de distribución a diferentes órganos (Shargel & Andrew, 1993 ; Burgeois, 1995 ; Grebb, 1995 ; Ciraulo y cols., 1995).

La absorción de un fármaco se describe como el movimiento de una sustancia desde el sitio de administración hasta el sitio donde va a ser medido. Los fármacos que se administran por vía oral se desintegran y disuelven en los jugos gástricos antes de la absorción (lo que ha sido llamado fase farmacéutica). La absorción oral depende de la concentración del fármaco, de su liposolubilidad, del pH intestinal y gástrico, de la motilidad intestinal y del área de absorción. Todo fármaco posee propiedades diferentes de desintegración (conversión a gránulos), disgregación (en partículas) y disolución (en iones o moléculas), las que dependen también del excipiente que acompaña al principio activo (Goodman y Gilman, 1996).

El pH del medio (intestinal o celular), determina la concentración de las formas iónicas y no iónicas de una sustancia. A mayor pH, mayor ionización de los ácidos y a menor pH, mayor ionización de las bases. A su vez, los ácidos se ubican en mayor concentración en el medio alcalino y las bases en un medio ácido debido a que en tales medios predominarían sus formas iónicas las cuales no logran atravesar las membranas (secuestro iónico) (Grebb, 1995).

Las interacciones absorptivas afectan la velocidad de absorción más que en una disminución de la cantidad absorbida. La absorción alterada de un fármaco es importante principalmente para aquellos que son administrados en dosis única, por pequeños períodos de tiempo o en forma intermitente. Cuando se administran fármacos en forma crónica el efecto en la velocidad de absorción no es tan significativo (Grebb, 1995).

La velocidad de absorción de un fármaco determina la rapidez de aparición ($t_{máx}$) y magnitud de los picos de concentraciones plasmáticas ($C_{máx}$). La vía de administración influye significativamente en la velocidad de absorción, la cual es más alta con fármacos de administración intravenosa > vía pulmonar > vía rectal > vía intramuscular (deltoides y vasto externo) > vía oral > vía subcutánea > vía dermatológica (Belknap y Nelson, 1993).

En la absorción se pueden presentar interacciones medicamentosas significativas, por ejemplo, los antiácidos que contienen magnesio y aluminio se unen a la clorpromazina formando un complejo insoluble, disminuyéndose la cantidad de principio activo disponible para la absorción. En una serie de veinte pacientes con dosis estables de clorpromazina, la administración simultánea de antiácidos redujo la excreción urinaria de clorpromazina en un 10% a 45% (Forrest y cols., 1970). La administración oral de

hierro teóricamente podría reducir la absorción de varios psicofármacos. Los psicofármacos con efectos anticolinérgicos pueden disminuir la motilidad gastrointestinal, incrementado el tiempo de exposición de los fármacos administrados a la mucosa intestinal y por lo tanto su absorción (Belknap y Nelson, 1993).

2.3.2. Enzimas Metabolizadoras de Fármacos (EMF)

Durante varias décadas (1950-1980) las enzimas metabolizadoras de fármacos (EMF) fueron generalmente descritas como sistemas hepáticos de destoxificación, responsables de la degradación de fármacos y otros contaminantes ambientales para facilitar su excreción. Sin embargo, es importante señalar que estas enzimas no son exclusivas del hígado, sino que se encuentran ampliamente distribuidas, y que la acción destoxificante tal vez representa menos del 1% de todas las funciones de las EMF (Nebert y Dieter, 2000). Desde el punto de vista evolutivo las EMF son muy antiguas, algunas de ellas existían desde antes de que ocurriera la divergencia entre las eubacterias y los eucariontes, sugiriendo que estas enzimas eran responsables de funciones vitales (por ej. balance electrolítico y división celular) mucho antes de la divergencia entre las plantas y animales. Las EMF también están implicadas en la síntesis y la degradación de todas las moléculas no peptídicas que participan en la modulación, vía ligando, del proceso de transducción que afecta el crecimiento, la apoptosis, la homeostasis y las funciones neuroendócrinas. Tal es el caso de la ciclo-oxigenasa, la leucotrieno-C₄ sintasa (una glutatión transferasa), la tromboxano-sintasa (CYP5) y la prostaciclina sintasa (CYP8) que representan cuatro de las muchas EMF que participan en la cascada del ácido araquidónico (Cervantes y cols, 2001).

Un fármaco dentro del cuerpo humano se ve afectado por procesos de unión a proteínas, distribución, metabolismo y excreción. Únicamente una pequeña fracción de la dosis total del fármaco es la responsable del efecto terapéutico, ya que el resto se metaboliza y se excreta. La manera en que el hígado metaboliza principalmente los fármacos varía dependiendo del tipo de molécula de que se trate, algunas son transformadas hasta CO₂ y H₂O y son eliminados por medio de la respiración, mientras que otras son modificadas para excretarse en la orina, la bilis o las heces (Cervantes y cols, 2001).

En el ser humano, las EMF pertenecen a varios tipos de enzimas que en conjunto son capaces de metabolizar casi cualquier compuesto químico al cual es expuesto el organismo. Los mecanismos de biotransformación de fármacos pueden dividirse en dos grupos: reacciones de fase I y reacciones de fase II, que dependen de distintos procesos bioquímicos.

2.3.3 Citocromos P450

Las enzimas citocromo P450 son los componentes terminales del sistema enzimático oxigenasa de función mixta (MFO)(Livingstone, 1993). En un principio los diferentes laboratorios obtuvieron resultados distintos y se creó cierta confusión con respecto a las funciones y características de las enzimas citocromo P450. Esto fue aclarado cuando se determinó que existían varios tipos de moléculas de citocromos P450 que se podían encontrar en individuos de una misma especie (Guengerich,1993).

Se ubican principalmente en el hígado, pero también en glándulas y tejidos del resto del cuerpo (testículos, glándulas adrenales) o tejidos involucrados en el procesamiento de alimentos (Guengerich, 1993; Livingstone, 1993)

En la figura 2 se muestra una forma simplificada de la estructura de la enzima citocromo P450, en el que se puede señalar que ésta posee sitios para atrapar dos moléculas: una de oxígeno (O_2) en el sitio hemo y el sustrato que se une justo por sobre el grupo hemo.

FIGURA N° 1

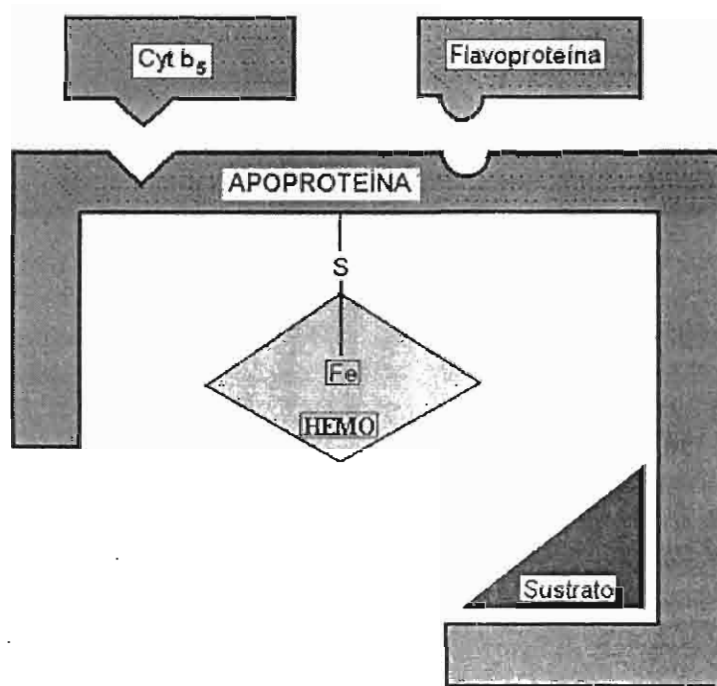


Figura.2. Estructura simplificada de una enzima citocromo P450.
(Tomado de Fossi y cols, 1997)

La figura 3 corresponde a la enzima citocromo P450 de la bacteria *Pseudomonas putida*, en el que se observa que está formada además por α -hélices (formas espirales) y hojas β (estructuras planas), además de segmentos no tan organizados (en forma de hilos).

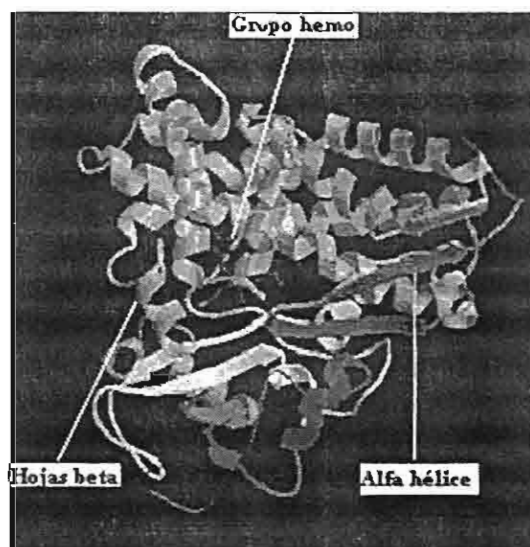


Figura 3. Modelo de enzima citocromo P450 de la bacteria *Pseudomonas putida*.
(Tomado de <http://www.proinco.net/staff/mogens/p450/antecede.html>)

2.3.4 Funciones que cumplen las enzimas citocromo P450.

Las enzimas citocromo P450 son un grupo, que en la actualidad el número de sustratos conocidos para estas enzimas está arriba de mil. Entre las funciones más importantes que realizan están las siguientes (Guengerich, 1993).

- a) Funciones detoxificadoras, eliminando sustancias exógenas, es decir, sustancias que no son sintetizadas en el propio organismo. Esto se logra agregando grupos funcionales, hidrosolubles a compuestos de carácter lipofílico. Entre éstos tenemos; fármacos, drogas, sustancias carcinogénicas, pesticidas, etc (Guengerich, 1993).
- b) Funciones de metabolismo endógeno, es decir, la degradación de sustancias del propio organismo. Como ejemplos de éstos: esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles (A y D), etc (Guengerich, 1993).
- c) La síntesis de óxido nítrico gaseoso simple, usado, entre otras funciones, como toxina anti-patógeno (Guengerich, 1993).
- d) En algunos organismos como mecanismo de defensa ante el ataque de alcaloides tóxicos de plantas (Guengerich, 1993).

Una importante característica de los citocromos, como el P450, es que son inducibles. Se sabe que la inducción selectiva de isoenzimas de P450 por diversos factores juega un papel importante en la determinación de efectos biológicos de varios compuestos químicos por ejemplo, el citocromo P450 2E1, está comprometido en el metabolismo oxidativo de medicamentos, procarcinógenos, protoxinas y muestra una correlación positiva en pacientes diabéticos tipo I con pobre control metabólico. Estos hallazgos suministran un nuevo argumento para tener un buen control metabólico en personas con diabetes mellitus (Guengerich, 1993).

Aunque la existencia de las enzimas citocromo (CYP) P450 se conoce desde años atrás, los esfuerzos para purificar y caracterizar las proteínas han sido más notorios con el advenimiento de la farmacogenética, que emerge como una subespecialidad de la farmacología clínica en respuesta a numerosos ejemplos y diferencias en la farmacocinética y farmacodinamia entre grupos étnicos genéticamente distintos (Guengerich, 1993).

Además de lo anterior, en enfermedades como la diabetes se han encontrado alteraciones en el metabolismo de medicamentos, al parecer por disfunción en el sistema del citocromo P450.

2.3.5 Mecanismos de acción

La acción de las enzimas que forman el complejo P450 puede explicarse en una serie de pasos químicos simples que se esquematizan en la figura 4.

1. Comienza atrapándose el sustrato al citocromo férrico (Fe^{3+})
2. Un electrón es transferido al átomo Fe, pasando éste a su estado ferroso (Fe^{2+}), esta transferencia es a veces realizada por proteína *citocromo b₅*,
3. Esta forma ferrosa se une a una molécula de O_2 ,
4. Se realiza una segunda reducción agregándose un electrón y además un protón
5. Este intermediario pierde una molécula de agua dejando un complejo $(\text{FeO})^{2+}$ que directamente oxida el sustrato.
6. El sustrato oxidado es liberado de la enzima

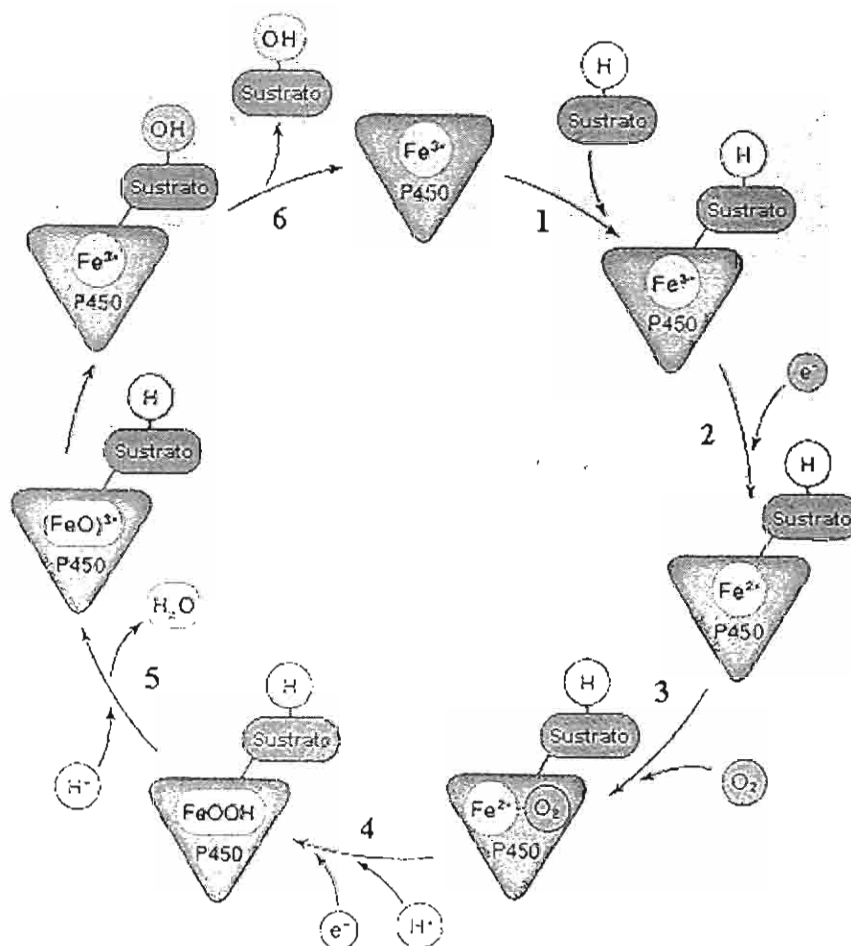


Figura 4. Mecanismo de acción del citocromo P450.

(Tomado de <http://www.proinco.net/staff/mogcns/p450/antecede.html>)

La Figura 5 muestra algunos de los posibles orígenes de los electrones involucrados en el proceso recién explicado. Se observa al citocromo P450 en la membrana del retículo endoplásmico. Los electrones involucrados en la oxidación de los sustratos en manos del citocromo P450 pueden provenir de FAD o el NADPH (fosfato dinucleótido nicotinamida-adenina) desde el citoplasma o desde el citocromo b5 que se encuentra en la membrana (Guengerich, 1993).

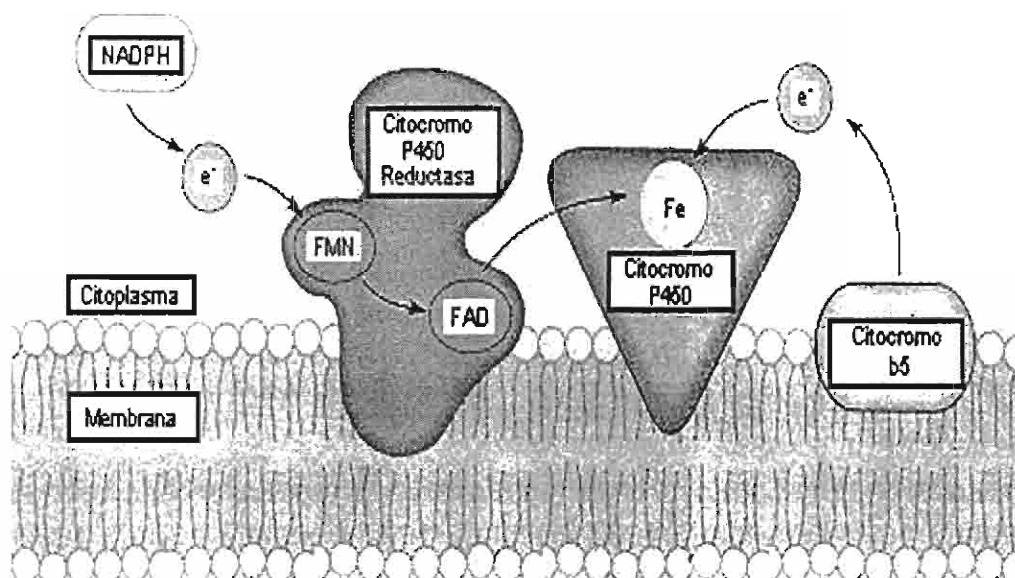


Figura 5. Componentes moleculares del sistema citocromo P450 celular en la membrana del retículo endoplásmico.

(Tomado de <http://www.proinco.net/staff/mogens/p450/antecede.html>)

2.3.6 Inducción de las enzimas citocromo P450

En la Figura 6 se muestra el sistema P4501A1 en el que un químico tóxico primeramente se une a un receptor arilhidrocarburo hidroxilasa (Ah) en el citoplasma de la célula y causa la liberación de la proteína de ataque térmico (hsp 90). Esta proteína es reemplazada por otra que es la ARNT. Este nuevo complejo entra al núcleo de la célula donde se une en forma específica una determinada región del DNA, que a su vez permite el acceso a factores de transcripción, encargados de transcribir los genes del P450 1A1, los RNA mensajeros pasan al citoplasma donde se transcriben a nuevas moléculas de enzima citocromo P450 que luego viajan al retículo y actúan en la degradación del químico tóxico (Shugart, 1996).

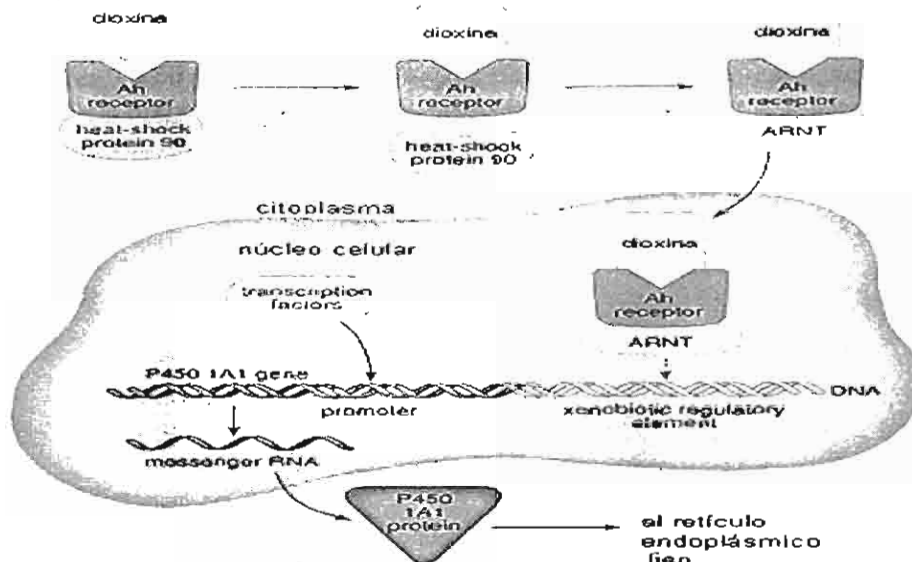


Figura. 6. Inducción de las enzimas citocromo P450.
(Tomado de Guengerich, 1993)

Las biotransformaciones oxidativas catalizadas por las monooxigenasas de citocromo P450 incluyen hidroxilación aromática y de cadena lateral, desalquilación de N, O y S, oxidación de N, sulfoxidación, hidroxilación de N, desaminación, deshalogenación y desulfuración. También se advierte catálisis de reacciones reductivas, por acción de enzimas de citocromo P450 y por lo común en un medio con baja tensión de oxígeno. La única característica común al grupo heterogéneo de xenobióticos oxidativos por enzimas de citocromo P450 es su gran liposolubilidad. (Benet y cols, 1996; Lehninger y cols, 2001).

La clasificación básica de la familia de multigenes del citocromo P450 se basa en la similitud de secuencias de proteínas individuales. Los miembros de una familia genética específica tienen una identidad que incluye más de 40% de los aminoácidos. Una familia específica del citocromo P450 suele dividirse en subfamilias, de tal manera que las secuencias protéicas dentro de la misma subfamilia son idénticas en más de 55% de los casos (De Groot y Vermeulen, 1997). En los seres humanos se han identificado 18 familias de genes CYP450 y 43 subfamilias, (tabla 1) y a menudo en una sola célula existen diversas enzimas de esta índole (Nelson, 2001; Agúndez y cols, 2001).

Existen numerosos genes citocromo P450 que codifican diferentes versiones de las enzimas, para fines prácticos, estos genes han sido agrupados en diferentes familias (números 1, 2, etc.), subfamilias (letras A, B, etc.), y enzimas individuales (números 1, 2, etc.). Por ejemplo, la enzima citocromo P450 inducida por el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (dioxina) se le da la designación P4501A1 (Shugart, 1996).

2.3.7. Reacciones de fase I

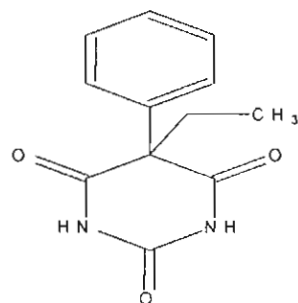
Las EMF de fase I están principalmente representadas por citocromos P450 (codificados por la familia de genes *CYP*) y participan en la detoxificación de sustratos reactivos mediante la formación de metabolitos intermedios, por reacciones metabólicas de reducción y oxidación. Estas reacciones permiten posteriormente la conjugación de los metabolitos intermedios formados, aumentando así su polaridad. En la fase II, las enzimas citocromo P450 son una familia compleja de enzimas bajo control genético. Los metabolitos generados por estas hemoproteínas son principalmente de dos tipos: electrófilos y radicales libres; los electrófilos son producidos por la oxidación de fármacos y generan metabolitos reactivos que actúan como arilantes o alquilantes, uniéndose covalentemente a sitios nucleofílicos, ejerciendo su toxicidad a través de la formación de enlaces covalentes (Williams, 1978).

➤ Oxidación: hidroxilaciones, desalquilación, desulfuración, deshalogenación.

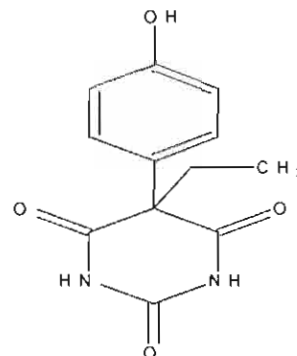
➤ Reducción: azorreducción, nitrorreducción.

HIDROXILACION:

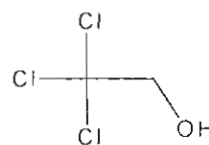
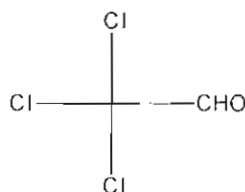
FENOBARBITAL



P-HIDROXIFENOBARBITAL



REDUCCION:



TRICLOROACETALDEHIDO

TRICLOROETANOL.

Figura 7. Metabolismo de fármacos (Tomado de Williams, 1978)

La hidrólisis consiste en la partición de una molécula por la adición de una de agua, es llevada a cabo por enzimas como las carboxilesterasas responsables de la transesterificación de la cocaína en presencia de etanol a etilcocaína, un compuesto altamente tóxico, las peptidasas y las hidrolasas epóxido (encargadas del metabolismo del 10,11-epóxido de carbamazepina). La reducción permite la conversión de sustituyentes nitro (-NO₂) a grupos amino (-NH₂), entre otros. Está conformada por azoreducción y nitroreducción (metabolismo del clonazepam a 7-aminoclonazepam), carbonilreducción (que convierte el haloperidol en haloperidol reducido), disulfidoreducción (convierte el disulfiram en un sulfihidrido), sulfóxidoreducción, N-oxidoreducción, quinona reducción y deshalogenación. La oxidación es llevada a cabo por enzimas hepáticas pertenecientes a la superfamilia de la citocromo P450 y está compuesta por procesos de hidroxilación, dealquilación y sulfoxidación. La hidroxilación conduce a la adición de un grupo hidroxilo (-OH) y se utiliza en el metabolismo de psicotrópicos como alprazolam, midazolam, triazolam, desmetildiazepam, barbitúricos, carbamazepina, fenitoína, desipramina, imipramina y propranolol, entre otros. La dealquilación está relacionada con la remoción de un grupo metil (-CH₃) o etil (-CH₂-CH₃) unido a un átomo de oxígeno (O), nitrógeno (N) o azufre (S) de la molécula. Se utiliza en el metabolismo de clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, prazepam, amitriptilina, fluoxetina, imipramina y sertralina, entre otros. La clorpromazina sufre un proceso metabólico de sulfoxidación, con la adición de un oxígeno (O) a un azufre (S). La oxidación además, permite la oxidoreducción de alcoholes por acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). El etanol se oxida a acetaldehído por la ADH (hígado > pulmón, riñón y mucosa gástrica). Una ADH atípica (con predominio de la subunidad b2), capaz de oxidar etanol más activamente, está presente en un 85% de los orientales vs. un 10% de los occidentales, permitiendo una gran formación de acetaldehído en los orientales. Sin embargo, un 45% a 53% de los orientales son deficientes en ALDH tipo 2 que permite convertir el acetaldehído en ácido acético llevándolos a experimentar una descarga autonómica similar a la producida tras el consumo de disulfiram. La nicotina es metabolizada por la ADH en cotinina. Otras enzimas oxidativas son las monoaminooxidasas que permiten la deaminación oxidativa de aminas primarias a amonio y aldehído. Se encuentran a nivel mitocondrial en el hígado, riñón, intestino, plaquetas y tejido neuronal y son fuente de peróxidos (H₂O₂) por ejemplo, la MAO-A metaboliza tiramina, dopamina, noradrenalina, adrenalina, triptamina, serotonina y haloperidol que es convertido a un metabolito piridínico neurotóxico (www.dml.georgetown.edu/deptspharmacology/davetab.htm).

Las reacciones de oxidación y reducción permiten posteriormente la conjugación de los metabolitos intermedios formados, aumentando su polaridad, en la llamada fase II.

2.3.8. Reacciones fase II

- Conjugación con ácido glucurónico
- Acilación
- Metilación
- Conjugación con ácidos mercaptúricos

Se da por enzimas ubicadas en el citosol, conducen a un incremento de la hidrofiliidad de los xenobióticos facilitando su excreción por riñón o bilis según sea su tamaño (Ej. acetilación y metilación), se lleva a cabo mediante la conjugación con un ácido: glucurónico, acético, sulfúrico o aminoácidos.

La glucuronidación es la vía de mayor actividad metabolizadora, se lleva a cabo en el retículo endoplásmico del hígado, riñón, intestino, piel, cerebro, bazo y mucosa nasal. Además de los xenobióticos, también son conjugados compuestos endógenos como la bilirrubina, las hormonas tiroideas y esteroideas. La metilación es una vía común pero menor de biotransformación de xenobióticos, tiene la facultad de disminuir la hidrosolubilidad de éstos. Utiliza como factor la S-adenosilmetionina (SAMe). Las reacciones de metilación convierten la S-adenosilmetionina (SAMe) en S-adenosilhomocisteína. Tienen como sustrato a catecolaminas y otras aminas aromáticas. La catecol-o-metiltransferasa (COMT) conduce a la o-metilación de catecolaminas y se ubica en el citosol; es codificada por un solo gen que sigue las leyes mendelianas y por ende se aprecia un polimorfismo genético. La acetilación permite la biotransformación de xenobióticos que contienen una amina aromática ($r\text{-NH}_2$) o un grupo hidrazina ($R\text{-NH-NH}_2$), produce metabolitos poco hidrosolubles, la reacción es catalizada por N-acetiltransferasas (NAT1 y NAT2) que se encuentran en el citoplasma de hepatocitos principalmente. La NAT2 metaboliza fármacos que han sido biotransformados por reacciones de tipo I como nitrazepam, clonazepam, fenelcina, cafeína e isoniazida. Se ha documentado un polimorfismo genético en las N-acetiltransferasas (Nebert, 1997^a; Nebert, 1991; Benet y cols, 1996).

Las EMF de fase II como las UDP-glucuronosil-transferasas, las glutatión-transferasas, las N-acetil-transferasas y las sulfotransferasas, no intervienen en la formación de metabolitos intermedios e involucran a una gran variedad de reacciones de conjugación, donde se agregan moléculas polares tales como ácido glucurónico, sulfatos, aminoácidos y muy especialmente glutatión (GSH). El GSH juega un papel importante debido a que su principal sitio nucleofílico es el grupo tiol de la cisteína en la célula, el GSH es la principal reserva de tioles. De esta forma, éste sirve como sustancia protectora ya que las GSH transferasas catalizan la detoxificación vía conjugación de metabolitos reactivos con GSH. Así los metabolitos electrofílicos interactúan preferentemente con el grupo tiol de GSH en vez de hacerlo con las proteínas constitutivas de membrana o enzimas, y sólo cuando éste se agota los metabolitos electrofílicos producen daño. Por lo tanto, las diferencias genéticas en la regulación, expresión y actividad de los genes que codifican para la EMF fase I y fase II deben ser factores cruciales en la definición de la susceptibilidad al cáncer, así como también en la determinación del potencial tóxico o carcinogénico de los fármacos y otros contaminantes ambientales (Nebert, 1997^a; Nebert, 1991; Benet y cols, 1996; http://escuela.med.puc.cl.paginas/publicaciones/Guias/dha/dha_1185.html).

2.3.9. Biotransformación (metabolismo o aclaramiento)

Los xenobióticos son químicos exógenos, usualmente liposolubles, que requieren ser convertidos en moléculas hidrosolubles para eliminarse del organismo. Esto se logra mediante la acción enzimática de los diferentes tejidos. Sus efectos pueden ser benéficos (conversión de profármacos en fármacos activos) o deletéreos (formación de metabolitos tóxicos). Cada fármaco puede tener un perfil farmacocinético diferente. La farmacocinética lineal no depende de la dosis administrada o de las concentraciones plasmáticas alcanzadas por poseer una vía metabólica no saturable o múltiples vías metabólicas, de tal manera que un cambio en la dosificación produce un cambio proporcional en los niveles plasmáticos. En otras palabras, al duplicarse la dosificación se duplican la $C_{máx}$ y el área bajo la curva (ABC). El área bajo la curva es aquella que se encuentra al correlacionar las concentraciones plasmáticas alcanzadas por un fármaco a una dosis determinada a lo largo del tiempo y hace referencia a la cantidad total absorbida. Por el contrario, la farmacocinética no lineal se caracteriza por saturación del metabolismo o la inducción enzimática, dependiendo de la dosis administrada o las concentraciones plasmáticas (este es el caso de psicofármacos como la carbamazepina, la paroxetina y la ziprasidona). Dicho de otra manera, los fármacos que son metabolizados en proporción a la cantidad acumulada en el cuerpo siguen una cinética lineal o de primer orden, mientras aquellos donde la misma cantidad es metabolizada por hora, independiente de la dosis administrada, siguen una cinética no lineal o de orden cero.

La biotransformación puede darse a través de cualquiera de los tejidos corporales, pero existen órganos con una acción metabólica predominante, el hígado, los pulmones, el intestino y los riñones. La acción metabólica genera metabolitos activos o inactivos o transforma profármacos en compuestos activos a través de la acción enzimática de las mitocondrias y microsomas hepáticos. Las enzimas que metabolizan xenobióticos se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico, mitocondrias, citosol, membrana plasmática o cubierta nuclear del hígado (microsomas > mitocondrias) > pulmón, piel, mucosa nasal, ojo, tracto gastrointestinal > riñón, adrenales, páncreas, bazo, corazón, cerebro, etc (Belknap, 1993).

Una forma de determinar la velocidad metabólica de un órgano como el hígado es a través del aclaramiento, el cual relaciona la concentración del fármaco con la velocidad de eliminación en un órgano y determina la eficiencia del mismo para remover el fármaco del organismo. El aclaramiento total es la suma de los aclaramientos de diferentes órganos ($Cl_{total} = Cl_{hepático} + Cl_{renal} + \dots$). El aclaramiento es expresado en términos de volumen (de sangre aclarada) por unidad de tiempo. Para determinarlo:

$$Cl = k_c \times VD$$

$$Cl = D / ABC \text{ (Belknap, 1993)}$$

2.3.10. Biodisponibilidad

Esta se refiere a la cantidad de fármaco administrada que alcanza la circulación sistémica (más allá de la circulación portal) con respecto a la alcanzada con la vía intravenosa (100% de biodisponibilidad) y promedio de la concentración plasmática sobre el intervalo de tiempo estudiado. Se calcula por medio de la razón entre el área bajo la curva (ABC) del preparado oral y el ABC del preparado I.V. Si la razón (f) es igual a 1, se dice que el medicamento tiene completa biodisponibilidad y no sufre alteración hepática (Greenblatt y cols., 1996). El área bajo la curva (ABC), es también un predictor de la concentración plasmática en el estado de equilibrio durante la administración crónica de un fármaco (Nuwer y cols., 1990). La biodisponibilidad depende de la presentación farmacéutica, de la desintegración y disolución del fármaco, del pH gastrointestinal, de la motilidad gastrointestinal, del estado de la flora intestinal, de la secreción biliar, de la administración concomitante con alimentos, del efecto de primer paso y de variables tales como la edad, la posición corporal y la actividad física tras la administración de la sustancia, de la presencia de una patología cardiovascular (que compromete la perfusión intestinal) y del embarazo. La administración intramuscular puede ser considerada equivalente a la intravenosa en este contexto (con excepción de la fenitoína, el diazepam y el clordiazepóxido) (Greenblatt & Koch-Weser, 1976), pero la gran mayoría de los psicofármacos tienen una biodisponibilidad oral considerablemente menor que la unidad; esto es debido a una absorción incompleta (poco frecuente) y a la extracción presistémica, la cual involucra el metabolismo dado en la mucosa gastrointestinal (por enzimas CYP3A) y el metabolismo de "primer paso" hepático (Thummel y cols., 1996). Así, el valor f de biodisponibilidad absoluta, sería igual a 1 menos el rango de extracción, el cual depende del aclaramiento de una dosis intravenosa del fármaco en evaluación sobre el flujo sanguíneo hepático. Los medicamentos con un alto aclaramiento hepático exhibirán pues una menor biodisponibilidad oral; tal es el caso para los antipsicóticos, ADT, ISRS y algunas BZD como triazolam y midazolam. El diazepam, desmetildiazepam, alprazolam y trazodona, por el contrario, exhibirán poca extracción presistémica por uno o ambos mecanismos (Greenblatt y cols., 1996). El metabolismo se puede saturar y un fármaco prolongar la vida media de otro o disminuirla.

El efecto de primer paso se refiere al fenómeno que se presenta después de la administración oral de un fármaco en el que un metabolismo parcial o total elimina una cantidad importante de ésta durante su primer paso por el hígado. La acción bacteriana en el lumen intestinal, las enzimas de la pared intestinal y el tejido pulmonar contribuyen al efecto de primer paso. Esto conduce a una disminución de la biodisponibilidad y a una disminución de la respuesta terapéutica.

La distribución es la medida del espacio disponible en el organismo (más allá del compartimiento plasmático) para albergar el fármaco. En otras palabras, es la relación entre la dosis administrada y la concentración en plasma. Se habla de volumen de distribución aparente (VD), ya que los datos obtenidos a través de las fórmulas matemáticas no corresponden a valores reales sino a valores hipotéticos que permiten comprender el grado de distribución del fármaco a los tejidos. El volumen de distribución se disminuye si el fármaco se une fuertemente a las proteínas plasmáticas (UAP), lo que lo retiene en el espacio vascular ($VD = 0.06 \text{ Lt/kg.}$). Si se presenta un paso a través del endotelio capilar pero no de las membranas celulares, en este caso por

baja UAP, pero baja liposolubilidad, la distribución alcanza el espacio intercelular únicamente ($VD = 0.2 \text{ L/kg.}$). Cuando el fármaco logra atravesar las membranas celulares y es captado por los tejidos, el volumen de distribución es tan amplio que los valores se consideran "sobrestimados" ($VD > 1 \text{ Lt /kg.}$). En caso de fármacos con alta UAP y VD elevados, la constante de afinidad por las primeras debe ser bajo. Todos los psicofármacos son bases débiles altamente liposolubles que tienen un alto volumen de distribución debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

La determinación del volumen de distribución de un fármaco se obtiene mediante la razón de su cantidad administrada o dosis (D) y su concentración plasmática inicial (Co), si se utiliza un modelo monocompartimental [$VD = D/Co$], o mediante la razón entre el aclaramiento renal (Cl) y la pendiente de la fase de eliminación (ke) [$VD = Cl/ke$] si el modelo es bicompartimental (Belknap, 1993).

Los fármacos viajan libremente en el plasma o unidos a proteínas (albúmina para fármacos ácidos y alfa glicoproteínas para los básicos). Los fármacos libres (fracción libre) se distribuyen a los tejidos por medio de la difusión, la cual depende de la concentración del fármaco, del coeficiente de difusión, de las características de la membrana y la velocidad de perfusión de cada tejido {adrenales (550 ml/100 gr./min.) > riñones (450) > tiroides (400) > hígado (95) > intestinos (75) > corazón [en estado basal] (70) > cerebro (55)}. La acumulación del fármaco depende de la velocidad de perfusión y de la afinidad del tejido por el fármaco.

La UAP es un proceso reversible (enlaces como puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals) o irreversible (enlaces covalentes). El fármaco que está unido a la proteína es usualmente inactivo. La UAP está determinada por la concentración y las propiedades del fármaco, la calidad y cantidad de proteína, la constante de asociación fármaco-proteína, las interacciones medicamentosas (competición o alteración de la afinidad de la proteína) y la condición fisiopatológica del paciente. La warfarina, la cual se une ampliamente a proteínas, puede ser desplazada por psicofármacos que se unan a ellas, como antidepresivos (exc. venlafaxina) y benzodiazepinas. Sin embargo, en la práctica el efecto de tal interacción parece ser de poca significancia en pacientes jóvenes saludables, ya que la Warfarina desplazada es sometida rápidamente a metabolización y distribución tisular, manteniéndose una fracción libre estable (Burgeois, 1995).

La UAP aumenta la duración del efecto, pues la sustancia unida no sufre procesos de filtración glomerular y se libera a medida que se aclara la que está en forma de fracción libre. La albúmina se encuentra en concentraciones de 35 a 50 gr/Lt, tiene una vida media de 18 días y tiene preferencia por fármacos ácidos (aniones). La alfa-glicoproteína tiene preferencia por fármacos básicos como los psicofármacos (aniones) y se encuentra a concentraciones de 0.4 a 1 gr/Lt, pero por ser un reactante de fase aguda exhibe una gran variabilidad intraindividual en sus niveles plasmáticos, incrementándose con situaciones de estrés como episodios depresivos o psicóticos, conduciendo a una disminución de la fracción libre y de la eficacia de antidepresivos o antipsicóticos (Ereshefsky y cols., 1996). Las lipoproteínas (especialmente cuando se satura la albúmina), las inmunoglobulinas y los eritrocitos son también capaces de unirse a fármacos. La unión a los glóbulos rojos está en relación inversa a la unión a la albúmina. La albúmina se une también a la bilirrubina, las hormonas, los ácidos grasos, al triptófano, etc. y es responsable de la presión osmótica que mantiene el volumen

intravascular. La distribución es inicialmente mayor en corazón, riñones y encéfalo (dependiendo de la capacidad del medicamento de atravesar la barrera hematoencefálica, del flujo sanguíneo cerebral y de la afinidad por receptores cerebrales), y menor en músculo y tejido graso; pero luego, la redistribución equilibra la concentración en todos los tejidos. La enfermedad hepática (que conduce a una menor síntesis de proteínas y a una menor calidad de la proteína), el catabolismo proteico (en caso de trauma o cirugía), la distribución de líquidos hacia el espacio extracelular (en caso de quemaduras) y la enfermedad renal, son factores que disminuyen la concentración de proteínas plasmáticas y permite niveles de fracción libre mucho mayores, trayendo como consecuencia un mayor riesgo de toxicidad. La enfermedad renal terminal, por ejemplo, puede alterar la UAP del diazepam (de un 99% a un 94%), del oxazepam (95% a 88%), del pentobarbital (66% a 59%), del fenobarbital (55% a concentraciones muy bajas), de la fenitoína (90% a 80%), del tiopental (72% a 44%), del triptófano (75% a valores muy bajos) y del ácido valproico (85% a menos). Sin embargo la UAP de la clorpromazina (98%), de la desipramina (92%), de la maprotilina (90%), la imipramina (95%), pimozide (98%), haloperidol (95%) o nortriptilina (94%), no se ven afectadas, ya que los niveles de alfa-glicoproteínas permanecen más estables (Shargel & Andrew, 1993).

La barrera hematoencefálica (BHE) se encuentra en todos los vertebrados y desde el primer trimestre de gestación en la especie humana. Se caracteriza por la presencia de uniones estrechas entre las células epiteliales de los capilares cerebrales, los cuales carecen por lo tanto de poros. Adicionalmente se encuentran prolongaciones de los astrocitos que cubren completamente la red de capilares cerebrales con excepción de algunos sitios como la hipófisis, la glándula pineal y el plexo coroides. Esto impide el paso de pequeñas moléculas, péptidos y fármacos que logran penetrar a otros tejidos. Las sustancias liposolubles de bajo peso molecular o aquellas que presentan afinidad por mecanismos transportadores localizados en la BHE, logran acceder al parénquima cerebral (Pardridge, 1988).

Las características morfológicas del endotelio capilar cerebral son debidas a factores tróficos (péptidos) producidos por los astrocitos. Esto pudo demostrarse ante el hallazgo que capilares del músculo de rata adquirían las características de la BHE al ser puestos en contacto con tejido cerebral (Pardridge, 1988).

Para el transporte de sustancias no liposolubles o de gran tamaño el endotelio utiliza varios mecanismos. El transporte mediado por un transportador permite el acceso de la glucosa al cerebro y de nutrientes como el ácido láctico, colina, arginina, adenosina o adenina y de hormonas tiroideas. Estos transportadores pueden ser regulados por características medioambientales como el incremento o la disminución de la glucosa. Estos transportadores poseen las características de saturabilidad, estereoespecificidad, competición e inhibición o inducción propias de otros sistemas similares. El transporte mediado por receptor permite el transporte de péptidos circulantes como la insulina (transcitosis), la activación de señales intracelulares o la alteración de la permeabilidad a nutrientes, agua o proteínas plasmáticas. El transporte mediado por proteínas plasmáticas permite la interacción de éstas con el endotelio capilar el cual induce cambios conformacionales transitorios en el sitio de unión del ligando modificando su constante de disociación (k_d). Esto ha conducido a la revaluación de modelos farmacocinéticos que sostienen que sólo la fracción libre puede ser transportada a través

de la membrana. Se han definido varias estrategias para la administración de fármacos no liposolubles al tejido cerebral. Algunas son invasivas como la infusión carotídea de un medio hipertónico (glucosa) o la infusión intraventricular (de poca eficacia pues el fármaco es rápidamente derivado al seno venoso sin ingreso al parénquima cerebral). La terapia con liposomas, profármacos liposolubles o formación quimérica de dos péptidos (uno con alta solubilidad) por un enlace covalente, parecen ser promisorias (Pardridge, 1988).

2.3.11. Excreción

Comprende varias vías: Renal filtración glomerular (principalmente fracción libre), secreción tubular (transporte activo a nivel del túbulo contorneado proximal), reabsorción tubular, depuración o aclaramiento (medida del fármaco excretado por unidad de tiempo = entre 0 y 650 ml/min.); Biliar: eliminación por heces o reabsorción en intestino delgado (circulación enterohepática); otras sería la láctea, el sudor, la saliva y las lágrimas.

A comienzos del S. XX se afirmaba que el transporte (secreción tubular) se daba en un sólo sentido. Desde 1949 se discutió la posibilidad de que los compuestos orgánicos secretados pudiesen estar sujetos a reabsorción. Finalmente se concluyó que el transporte en ambas direcciones dependía de la difusión pasiva de elementos no ionizados y por lo tanto del pH (el cual si es elevado altera la eliminación de las bases débiles como los psicotrópicos), mientras la secreción tenía un mecanismo activo para ácidos y bases orgánicas débiles. Además de la filtración glomerular, los ácidos y bases débiles sufren un proceso de secreción en el túbulo contorneado proximal que requiere energía, es susceptible a inhibición metabólica, tiene una capacidad limitada de transporte, es utilizado por varias sustancias (competitivo) y puede ser inhibido por agentes farmacológicos. La difusión pasiva, en cambio, depende del gradiente de concentración de especies no polares determinado por el pH urinario, la velocidad de flujo urinario y el flujo sanguíneo renal. La difusión pasiva es el mecanismo utilizado para la reabsorción, la cual suele darse en una porción del túbulo distal a la secreción. La reabsorción de partículas cargadas (iones) se produce a través de poros paracelulares permeables al agua y otras sustancias de bajo peso molecular. Existen mecanismos secretores para ácidos y bases orgánicas que no dependen del pH ni de la polaridad de las sustancias (Burgeois, 1995).

Para fármacos que siguen una cinética de primer orden, el tiempo que toman para que sus niveles plasmáticos disminuyan en un 50% se ha denominado vida media ($t_{1/2}$). Este parámetro permite establecer algunas veces la dosificación adecuada de un fármaco (con cinética de primer orden o declinación exponencial de los N.P. que significa que la velocidad de eliminación es proporcional a la cantidad de fármaco en el cuerpo). Es un indicador del tiempo necesario para alcanzar el estado de "meseta o equilibrio" después de iniciado un tratamiento y permite conocer el tiempo necesario para la remoción de un principio activo. La $t_{1/2}$ se calcula dividiendo el logaritmo natural de 2 (0.693) por la pendiente de la fase de eliminación (ke) [$t_{1/2} = 0.693/ke$] (Burgeois, 1995).

El estado de meseta (o los niveles plasmáticos en estado de equilibrio) es aquél que se presenta cuando las concentraciones plasmáticas se vuelven estables. Un 50% de la eventual concentración en estado de equilibrio se alcanza con una vida media, 90% con 3.3 vidas medias y más de un 97% con 5 vidas medias. Los niveles plasmáticos en estado de equilibrio dependen de la biodisponibilidad y el metabolismo de un fármaco, pero no de su distribución. En cambio, la vida media es influenciada tanto por el metabolismo como por la distribución. Así, en sujetos de edad, donde la proporción de grasa corporal es más alta, el estado de meseta es similar al de los adultos jóvenes, pero la vida media suele ser mayor con la misma dosis (Burgeois, 1995).

2.4. Fase Farmacodinámica

La farmacodinamia es el mecanismo de acción y efectos de la interacción fármaco-órgano blanco que conducen a un efecto terapéutico y a los efectos secundarios. Hasta el S.XIX, la terapéutica se basaba en la administración de extractos derivados de plantas sin juicio racional alguno sobre el efecto que los mismos producían en el organismo. Esta confianza en los productos naturales prosperó hasta los años veinte cuando los primeros compuestos sintéticos fueron introducidos. Paul Ehrlich insistía en que la acción de los fármacos debería conocerse en términos de interacciones químicas entre los fármacos y los tejidos. Desafortunadamente el empirismo clínico y la práctica de los principios homeopáticos de Hahnemann (lo similar cura lo similar y la actividad se incrementa con la dilución) siguen teniendo vigencia hoy en día. Virchow en el siglo XIX afirmaba : "La terapéutica es un estado empírico llevado a cabo por doctores y clínicos prácticos, y es por medio de una combinación con la fisiología que ella puede llegar a ser una ciencia" (Grebb, 1995).

Las moléculas farmacológicas deben ejercer un efecto en uno o más constituyentes celulares para producir una respuesta farmacológica. En muchos casos se requiere que las moléculas no sean uniformemente distribuidas en todo el organismo y que se unan a constituyentes particulares de las células. El conocimiento de estas interacciones particulares es la esencia de la farmacodinamia. En la interacción de los fármacos participan cuatro tipos de proteínas reguladoras: enzimas, moléculas transportadoras, canales iónicos y receptores. Durante la fase farmacocinética se describió la interacción con las células absortivas, proteínas plasmáticas y las enzimas hepáticas. El mecanismo de acción de los diferentes fármacos puede determinarse a través de trabajos de experimentación *in vitro* e *in vivo*, en tejidos animales o humanos. Los avances en la biología molecular y las técnicas de neuroimágenes han permitido ir conociendo la forma como se comportan los diferentes psicofármacos ante su sitio de interacción. Inicialmente, por ejemplo, los receptores eran clasificados según su interacción con un ligando radiomarcado. Hoy se cuentan con técnicas de clonación molecular que permiten conocer la secuencia aminoacídica de los receptores y proteínas intracelulares y conocer con más detalle la presencia de subtipos de receptores con diferentes funciones. La *International Union of Pharmacological Sciences* (IUPHAR) es el organismo conformado por un grupo de expertos que definen la clasificación de los receptores de acuerdo a su perfil farmacológico, molecular y bioquímico (Grebb, 1995).

2.4.1. Eficacia de los fármacos

El concepto de eficacia no se refiere sólo a la propiedad de un fármaco para promover una respuesta fisiológica "positiva" ; es la propiedad del fármaco que modifica la subsecuente interacción de los receptores con otras proteínas de membrana (un cambio en el estado del complejo RG). Existen tres tipos de eficacia o respuesta ante la interacción de un fármaco con un receptor, recientemente definidas. Un fármaco agonista positivo puede ser antagonista o agonista inverso dependiendo del sistema celular en el que se encuentren (Kenakin, 1996).

Efectos adversos e interacciones medicamentosas

La acción de los diferentes fármacos no es sólo de tipo terapéutico; muchos de ellos poseen interacciones con otros receptores o sitios de acción que dan lugar a la aparición de efectos secundarios no deseables, muchas veces intolerables, y que obligan a la suspensión o cambio del plan terapéutico. Una reacción adversa puede ser definida como una reacción a un fármaco o a una combinación de fármacos que no era esperada, potencialmente peligrosa y que puede presentarse incluso a dosis terapéuticas. Cuando las reacciones son esperables se denominan efectos colaterales, no siendo siempre indeseables (Nierenberg y Cole, 1991).

Las dosis elevadas (muchas veces injustificadas) suelen ser la primera causa de aparición de efectos adversos. Hasta un 75% de los efectos adversos son relacionados con las dosis y son teóricamente prevenibles (Melmon, 1971). La politerapia y los tratamientos prolongados también contribuyen a una mayor presentación de efectos adversos. Los grupos de pacientes susceptibles está constituido por ancianos, niños, embarazadas (en especial litio y anticonvulsivantes), pacientes con enfermedad sistémica o trauma encefalocraneano, presencia de estresores psicosociales y presencia de una enfermedad psiquiátrica asociada a la que ha requerido el tratamiento (Gerner, 1993).

A pesar de las múltiples publicaciones sobre los efectos adversos de cualquier fármaco y de la determinación de sus niveles de toxicidad en estudios de animales (índice terapéutico), la incidencia de efectos adversos no puede ser prevista con precisión en un individuo, pues dependen en buena medida del grado de susceptibilidad del paciente debido a las características inmunológicas particulares y al polimorfismo genético que determina las diferencias observadas entre los individuos en el metabolismo de un fármaco (reacciones idiosincrásicas).

Algunos de los efectos adversos más comunes son causados por el bloqueo de los receptores muscarínicos o de otros receptores monoaminérgicos y muchas interacciones medicamentosas de tipo farmacodinámico pueden explicarse por la acción sobre sistemas similares u opuestos (Richelson, 1991 ; Grebb, 1995).

Las interacciones medicamentosas se presentan cuando un fármaco altera la respuesta del paciente a otro fármaco. Es clínicamente significativa cuando incrementa o disminuye la eficacia, o cuando incrementa o disminuye la toxicidad de uno o más de los fármacos involucrados. La presentación de interacciones es variable según los estudios realizados y los fármacos evaluados, con un rango amplio que va del 2% al 70% (Belknap y Nelson, 1993). Las interacciones que dependen de las características farmacocinéticas de los fármacos fueron analizadas en sus respectivas fases. Las interacciones farmacodinámicas son mediadas por receptores o debidas a respuestas fisiológicas.

Índice terapéutico

Matemáticamente se ha definido como la diferencia entre la exposición efectiva mínima y la máxima exposición tolerable a un fármaco. Un medicamento de índice terapéutico estrecho es aquél en el que pequeños cambios en las concentraciones sistémicas llevan a marcados cambios en las respuestas farmacodinámicas. La FDA acepta que un medicamento posee un índice terapéutico estrecho cuando la diferencia entre la dosis letal media (DL_{50}) y la dosis efectiva media (DE_{50}) es menor de dos y cuando el uso seguro y efectivo de un fármaco requiere una cuidadosa titulación y monitoreo. Los medicamentos como el litio, clonidina y fenitoina, de amplio uso en psiquiatría, son considerados como fármacos de índice terapéutico estrecho (Levy, 1988).

2.5. Nomenclatura de los citocromos P450

Los estudios en animales de laboratorio y en seres humanos han caracterizado 221 genes para la expresión del sistema citocromo P450, que se clasifican según las estructuras en 36 familias; 12 de estas familias de genes existen en todos los mamíferos y se han subdividido en 22 subfamilias³. Las familias y subfamilias de enzimas se definen con base en la similitud en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el citocromo P450 de una familia, exhibe hasta 40% de similitud con otra familia de P450; la subfamilia siempre comparte más de 55% de similitud en la secuencia. Directory of P450-containing systems, 1997. <http://www.icegeb.trieste.it/p450>

Tabla 1. Familias de citocromo P450

CYP1	Metabolismo de fármacos (3 subfamilias)
CYP2	Metabolismo de fármacos y esteroides (13 subfamilias)
CYP3	Metabolismo de fármacos (1 subfamilia)
CYP4	Metabolismo de ácido araquidónico o ácidos grasos (5 subfamilias)
CYP5	Tromboxano A2 sintetasa (1 subfamilia)
CYP7A	Biosíntesis de ácidos biliares (Miembro de la subfamilia)
CYP7B	7-alfa hidroxilasa (miembro de la subfamilia)
CYP8A	Prostaciclina sintetasa (miembro de la subfamilia I)
CYP8B	Biosíntesis de ácidos biliares (miembro de la subfamilia I)
CYP11	Biosíntesis de esteroides (2 subfamilias)
CYP17	Biosíntesis de esteroides (1 subfamilias)
CYP19	Biosíntesis de esteroides (1 subfamilias)
CYP20	Función desconocida (1 subfamilia)
CYP21	Biosíntesis de esteroides (1 subfamilias)
CYP24	Degradación de vitamina D (1 subfamilia)
CYP26A	Hidroxilasa de ácido retinoico (miembro de la subfamilia I)
CYP26B	Probable hidroxilasa de ácido retinoico (miembro de la subfamilia I)
CYP26C	Probable hidroxilasa de ácido retinoico (miembro de la subfamilia I)
CYP27A	Biosíntesis de ácidos biliares (miembro de la subfamilia I)
CYP27B	Vitamina D3 1-alfa hidroxilasa activadora de vitamina D3 (miembro de la subfamilia I)
CYP27C	Función desconocida (miembro de la subfamilia I)
CYP39	Función desconocida (miembro de la subfamilia I)
CYP46	Colesterol 24-hidroxilasa (miembro de la subfamilia I)
CYP51	Biosíntesis de colesterol (1 subfamilia)

(Tomado de Nelson, 2001)

Los citocromos P450 se denominan con la raíz CYP (Citocromo P450) seguida de un número arábigo, una letra y otro número arábigo, según el gen de la familia, subfamilia y forma de P450, respectivamente. Directory of P450-containing systems, 1997. <http://www.icegeb.trieste.it/p450>

2.5.1. Importancia de los Citocromos P450

Se piensa que sólo tres de las familias de genes (CYP1, CYP2 y CYP3) son responsables de la mayoría del metabolismo xenobiótico. En la tabla 2 se encuentran algunas enzimas del citocromo P450 con ejemplos de los sustratos más conocidos y los fármacos que los pueden inhibir o inducir (Wrigton y Stevens, 1992). A pesar del hecho que muchas de estas enzimas comparten sustratos específicos, en ciertas condiciones una única enzima del P450 interviene en la detoxificación o biotransformación de un compuesto en particular. El metabolismo de los medicamentos está sujeto a control

genético y depende de las cantidades de diversas clases del P450 expresadas en un órgano determinado. Así es posible determinar el metabolismo, la actividad farmacológica y la toxicidad de un compuesto. Los CYPs están bajo la influencia de varios factores como edad, sexo, temperatura, ambiente químico, medicamentos y enfermedades como se resume en la Figura 8.

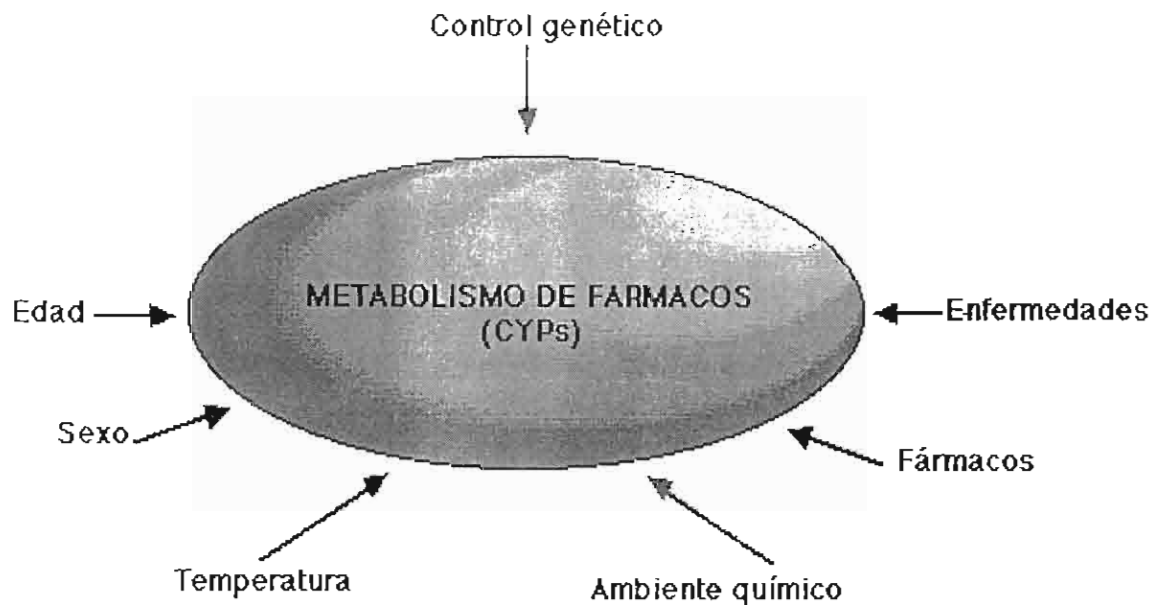


Figura 8. Factores que regulan la expresión de los citocromos P450.
(Tomado de Maya y cols, 1995)

El sistema P450 puede tener repetidos ciclos de oxidación/reducción durante el metabolismo de endobióticos y xenobióticos, sin apreciable daño estructural. Sin embargo, la participación del P450 termina un proceso que se clasifica como inactivación "suicida" (Ortiz Montellano y Reich, 1986). Hasta ahora, se han caracterizado 3 mecanismos distintos de inactivación: a) destrucción del heme prostético vía N-aquil/arilación; b) alquilación del apocitocromo, por un reactivo intermedio (Roberts y cols, 1993).

Tabla 2. Algunas enzimas del citocromo P450 con ejemplos de los sustratos más conocidos y los fármacos que los pueden inducir o inhibir.

Enzima	Sustratos (metabolizados)		Inductores		Inhibidores	
CYP1A2	Acetaminofen Amitriptilina Paracetamol Clomipramina Teofilina	Amitriptilina Propranolol Clozapina Tacrina	Nicotina Omeprazol Fenobarbital	Primidona Rifampicina	Erithromicina Fluvoxamina Mexiletine Norfloxacina Ritonavir Tacrine	Anastrozol Cimetidina Ciprofloxacina Diltiazem Enoxacina
CYP2A6	Nicotina Tamoxifen	Ritonavir	Barbitúricos			Ritonavir
CYP2C9	Losartan Amitriptilina Fenitoina Acenocumarol Carvedilol Diclofenaco	Fluoxetina Torasemida Tolbutamida Warfarina Dapsona Dronabinol	Rifampicina		Amiodarona Anastrozola Cimetidina Diclofenac Disulfiram Fluconazol Fluvoxamina Flurbiprofen Fluvastatina	Ketoprofeno Metronidazol Fenilbutazona Ritonavir Sulfipirazona Sulfonamidas Sulfamethoxazol- trimetoprim Troglitazona Zafirlukast
CYP2C19	Diazepam Imioramina Omeprazol Pentamidina	Clomipramina Citalopram Propranolol Hexobarbital	Rifampicina	Barbitúricos	Felbamato Fluoxetina Fluvoxamina Omeprazol	Ritonavir Tolbutamida Troglitazona
CYP2D6	Amitriptilina Clomipramina Fluoxetina Paroxetina Codeína Dextrometorfano Propranolol Tramadol	Debrisoquina Disipramina Doxepin Imipramina Haoperidol Timolol Metoprolol Tioridazina Espaceína	-----	-----	Amiodarone Fluoxetina Flufenazina Fluvoxamina Halopendol Lomustine Norfluoxetina Paroxetine Perphenazine Propafenone	Quinidina Ranitidina Ritonavir Sertindol Sertrain Tioridazin Venlafaxin Vinblastine Vinorelbin
CYP2E1	Paracetamol Cafeína Dapsona	Acetaminofén Teofilina Etanol p-Nitrofenol	Etanol	Isoniazida	Disulfiram	Ritonavir
CYP3A4	Amiodarona Simvastatina Astemizol Rifabutina Ciclosporina	Lovastatina Midazolam Ebasteína Lidocaina Cisaprida	Carbamazepine Dexametasone Glucocorticoides Fenobarbital Fenilbutazona	Fenitoina Primidona Rifabutina Rifampicina Sulfipirazona	Anastrozol Cimetidina Clotrimazol Danazol Delavirdina Diltiazem Eritromicina Fluconazol Fluoxetina Fluvoxamina Jugo de toronja Indinavir Itraconazol Ketoconazol Metronidazol Miconazol	Nefazodona Nelfinavir Nevirapine Norfluoxetina Omeprazol Paroxetina Propoxifeno Quinidina Ranitidina Ritonavir Saquinavir Sertindol Troglitazona Troleandomicina Zafirlukast Zileuton

Obtenida de (d'Hebron, 1999; Melanic y cols, 1998; <http://www.edhayes.com/startp450.html>)

Aún cuando las familias 1,2 y 3 del citocromo P450 (CYP1, CYP2 Y CYP3) codifican las enzimas que intervienen en la mayor parte de la biotransformación de los fármacos, los productos génicos de las demás familias del citocromo son importantes en el metabolismo de compuestos endógenos, esteroides y ácidos grasos. En la Figura. 9 se muestra la contribución relativa de las principales enzimas del citocromo P450 del ser humano en el metabolismo de fármacos. Como resultado de la especificidad relativamente pequeña por sustrato entre las proteínas del citocromo P450, dos o más enzimas individuales suelen catalizar una reacción de biotransformación particular. CYP3A4 interviene en la biotransformación de casi todos los fármacos, y se expresa en niveles notables fuera del hígado (Goodman y Gilman, 1996).

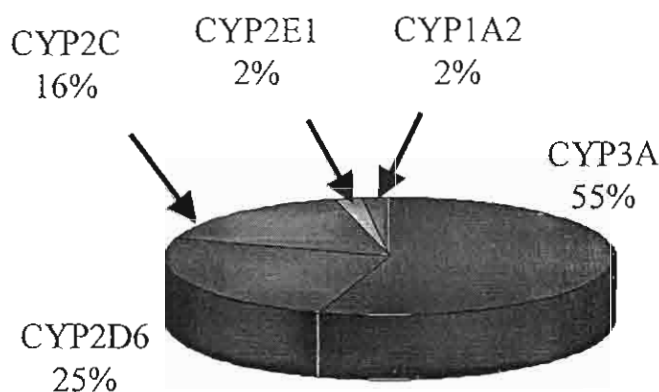


Figura 9. Enzimas del citocromo p450 y su actividad en el metabolismo de fármacos en el mercado (Tomado de Goodman & Gilman, 1996).

2.6. El polimorfismo genético de CYP2D6

Los fármacos pueden producir efectos indeseados porque se acumulan hasta que alcanzan concentraciones anormales elevadas, que son tóxicas. Esto ocurre cuando los sistemas de eliminación no funcionan con la efectividad esperada (d'Hebron, 1999).

En un estudio realizado en 1975 por investigadores británicos sobre la farmacocinética del agente antihipertensivo debrisoquina, se observó un episodio de hipotensión severo en algunos individuos. Se comprobó que estos efectos secundarios estaban relacionados con la dosis del fármaco y eran resultado de la incapacidad del paciente para eliminar la debrisoquina mediante la conversión a su metabolito hidroxilado inactivo. Posteriormente, los estudios familiares y poblacionales verificaron la naturaleza genética de este efecto metabólico y establecieron su naturaleza polimórfica al observar que 5-10% de la población caucásica era metabolizador pobre (PM) en relación con el resto (EM o metabolizador extenso) (Mahgub y cols, 1977).

En la misma época, investigaciones independientes sobre la variación de la respuesta al agente antiarrítmico y oxiótico, esparteína, descubrieron que una proporción similar de sujetos en Alemania eran incapaces de convertir enzimáticamente a la esparteína en sus metabolitos 2 y 5-dihidroesparteína (Kalow y Grant, 2001; Estévez y cols, 1997).

En los años ochentas y los noventas la variabilidad individual en la hidroxilación fue objeto de una intensa investigación, ahora se sabe que algunos citocromos presentan polimorfismo genético. Esto significa que se pueden distinguir dos poblaciones diferenciadas, según la capacidad y la velocidad de metabolización de sustratos farmacológicos. Los individuos con genotipo homocigoto normal y los heterocigotos se denominan metabolizadores extensos (EM) Los homocigotos con enzima de actividad reducida o ausente se denominan Metabolizadores pobres (PM), este fenotipo es un rasgo hereditario autosómico recesivo. Algunos individuos son denominados metabolizadores Ultrarrápidos (UM) debido a que presentan una velocidad aumentada de metabolización porque tienen una o más copias de genes metabolizadores. Estas diferencias pueden ser causa de variabilidad en la respuesta a los fármacos eliminados por esta vía (Melanie y cols, 1998; Gaedigk y cols, 1991).

El polimorfismo debrisoquina/esparteína es uno de los defectos genéticos más extensamente estudiados, que afectan el metabolismo oxidativo de fármacos en los seres humanos (Gaedigk y cols, 1991). El polimorfismo que presenta este gen se debe a la presencia de mutaciones puntuales, deleciones o inserción de nucleótidos y duplicación del gen completo (Gaedigk y cols, 1999).

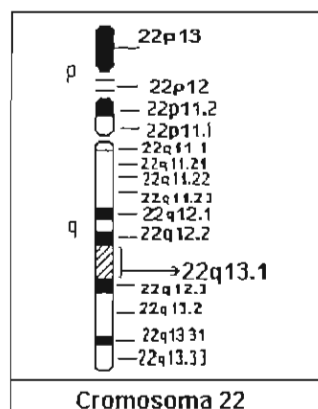


Figura 10. Localización del gen *CYP2D6*.

El citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*), también conocido como hidroxilasa de debrisoquina/esparteína juega un papel muy importante en el metabolismo de aproximadamente el 25% de los fármacos que actualmente se utilizan en la práctica clínica, en los cuales se incluyen antidepresivos tricíclicos, agentes neurolépticos (haloperidol) β -bloqueadores y antiarrítmicos (Gaedigk y cols, 1999). El *CYP2D6* metaboliza los fármacos mediante reacciones de hidroxilación, O-demetilación y posiblemente mediante reacción de N-desalquilación (Riesenman y Pharm, 1995).

El gen *CYP2D6* se localiza en el cromosoma 22q13.1 (Figura 10), en asociación con los pseudogenes *CYP2D7P* y *CYP2D8P*. Sin embargo sólo un alelo de este gen *CYP2D6* *1 codifica para una enzima funcional (Schur y cols, 2001; Kimura y cols, 1989).

Desde hace 10 años se ha realizado un gran esfuerzo para emprender la identificación de los alelos polimórficos del gen *CYP2D6*, así como la caracterización de los productos del gen y las consecuencias sobre el fenotipo. (Daly y cols, (1996). En la nomenclatura aceptada hoy en día, se nombra al alelo silvestre como *CYP2D6*1* y a los diferentes alelos determinados con números subsecuentes; actualmente se han descrito as de 60 alelos [http://www.imm.ki.ac\(CYPalleles\)](http://www.imm.ki.ac(CYPalleles)) Sin embargo dos variantes alélicas del gen *CYP2D6*, *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4*, han sido consideradas como uno de los principales factores críticos que causan susceptibilidades individuales en la respuesta a los fármacos. El polimorfismo *CYP2D6*3* se caracteriza por una delección de una A₂₆₃₇ en el exón 5, con una frecuencia de 2.7%. El polimorfismo *CYP2D6*4* se caracteriza por una substitución de G₁₉₃₄ → A, con una frecuencia de 21.5 a 28.6%. Otros polimorfismos poco comunes representan el 1% de las variaciones alélicas de *CYP2D6*. (Schur y cols, 2001; Kimura y cols, 1989).

Tabla 3. Análisis comparativo de frecuencias alélicas *CYP2D6* en diferentes poblaciones.

Población	n	CYP2D6*1	CYP2D6*3	CYP2D6*4
Europea ¹	672	0.334	0.018	0.0189
Norte Americana ² (Missouri-Kansas)	208	0.370	0.010	P
Caucásica ³ (Alemania)	589*	0.364	0.020	0.195
	195**	0.356	0.010	0.019
Etíopes ⁴	122	ND	0.0	0.0012
Zimbabweans (África)	76 ^a 80 ^b 114 ^c	0.390 ^{a,b}	0.0 ^c	0.75
Chinos	113 ^d 124 ^e	0.269 ^d	ND	0.08
Tanzania ⁵ (Bantú)	106	0.278	0.0	0.009
Ghanianos ⁶ (Ghana)	193	0.437	0.0	0.07
Colombiana ⁷	121	0.388	0.12	0.194
Mexicana ⁸ (Los Ángeles)	349	ND	0.003	0.0103
Mexicana ⁹ (Galicia y cols, 2002)	130	0.990	0.010	0.11
Mexicana (Con EH)	70	0.88	0.0117	0.15

ND, no determinada, ¹Marez y cols, 1997(n=672); ²Gaedigk y cols, 1992 (n=208); ^{3*}Sachse y cols, 1997 (n=589); ^{3**}Griese y cols, 1998 (n=195); ⁴Aklillu y cols, 1996 (n=122); Masimirembwa y cols, (⁴1996 (n=76), ^b1996b (n=80), ^c1993 (n=114); ⁴Johansson y cols, 1994(n=113); ⁵Wang y cols, 1993 (n=124); ⁵Wennerholm y cols, 1999 (n=106); ⁶Griese y cols, 1999 (n=193); ⁷Isaza y cols, 2000 (n=121); ⁸Mendoza y cols 2001 (n=349).

Las distribuciones desiguales de los fenotipos UM, EM y PM entre las diferentes poblaciones mundiales conducen a diferencias metabólicas interraciales además de las variaciones individuales ver tabla 3. Las diferencias individuales en las velocidades metabólicas alteran la relación esperada entre la dosis de un fármaco y su concentración en la sangre o el tiempo que permanece en la sangre. Más aún, un polimorfismo en esta enzima (*CYP2D6*) puede conducir a un efecto terapéutico prolongado o excesivo, o incluso a un efecto tóxico después de la administración de una dosis normal del fármaco. Los individuos metabolizadores lentos pueden tener mayor predisposición a efectos colaterales de ciertos fármacos (García y cols, 2001). Se ha podido comprobar que algunas reacciones adversas de tipo A (o efecto farmacológico aumentado), que dependen de la concentración del fármaco, son más frecuentes entre los hidroxiladores pobres, mientras que las causadas por metabolitos activos son más frecuentes entre los menos frecuentes hidroxiladores ultrarrápidos. Así, por ejemplo, es muy probable que la fenformina, una biguanida de administración oral utilizada en el tratamiento de la diabetes, fue la causa de acidosis láctica (efecto tipo A) casi exclusivamente en metabolizadores pobres del *CYP2D6* (Bertilsson L, 1996).

El efecto analgésico de la codeína, que es atribuible a la morfina formada a partir de la primera por acción del *CYP2D6*, es nulo o muy escaso entre los hidroxiladores pobres, que no producen morfina (d'Hebron, 1999). Es importante señalar que se han observado diferencias interpersonales entre los sujetos PM y EM, debido a que la enzima *CYP2D6* metaboliza sustancias críticas para el sistema nervioso central, tal como se observa en el riesgo de 2 a 2.5 veces más de desarrollar enfermedad de Parkinson en individuos PM que en los EM. (Gerard, 2002, Harhangi, 2001). Esto probablemente se debe a que los individuos con un defecto en los mecanismos de hidroxilación son más susceptibles a neurotoxinas ambientales (Cervantes y cols, 2001). La identificación de sujetos UM tiene gran valor potencial clínico, ya que cuando los pacientes no responden a las dosis estándar y tienen concentraciones plasmáticas más bajas de lo esperado, en relación a la dosis, es importante distinguir entre la capacidad de metabolización elevada y la falta de respuesta al medicamento. Por otro lado, los individuos UM de *CYP2D6* frecuentemente resultan de la herencia de alelos duplicados o genes *CYP2D6* funcionalmente amplificados (Lovlie y cols, 2001).

Se ha observado que las frecuencias fenotípicas, de *CYP2D6*, entre diferentes grupos étnicos son muy variables. Por ejemplo, la frecuencia con que se presenta el fenotipo PM en población caucásica es de 5 a 10% y en la población asiática es de 1%, en grupos americanos es de 2%, y para zimbaweanos es de 0-8% dependiendo del fármaco que se utilice para la prueba (Mendoza y cols, 2001; Wennérholm y cols 1999; Gaedigk y cols, 1999).

Además, se han observado diferencias en las frecuencias de los alelos mutados que dependen del origen étnico de la población. Por ejemplo, la frecuencia de duplicación de *CYP2D6* varía notablemente, esto es 29% en etíopes (Aklillu y cols, 1996), 20% en árabes sauditas (McLellan y cols, 1997), 1-7% en caucásicos (Agúndez y cols, 1994) y 1-2% en orientales (Dahl y cols, 1995).

2.7. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo que, por lo general, se presenta en la cuarta década de la vida. Es una enfermedad autosómica dominante que se manifiesta por movimientos involuntarios, pérdida progresiva de las funciones cognitivas y cambios de la personalidad, la muerte se presenta 15-20 años después de las primeras manifestaciones clínicas, y en un lapso menor en los casos juveniles; neuropatológicamente hay muerte celular que afecta principalmente al caudado-putamen y a la corteza cerebral. Neuroquímicamente, en el caudado-putamen de los pacientes hay disminución en la concentración de los neurotransmisores glutamato y del ácido gamma amino-butírico (GABA) (Resinc y cols.1977; London y col. 1981; Penney y col 1990; Dure 1991).

En 1983 se descubrió que el gen responsable de esta enfermedad se localiza en el cromosoma 4p, y en 1993 el gen fue clonado y se encontró que tiene un repetido CAG polimórfico. La EH es resultado de las variantes alélicas del gen que codifica para una proteína de 348,000 daltones denominada huntingtina (The Huntington's disease collaborative research group, 1993).

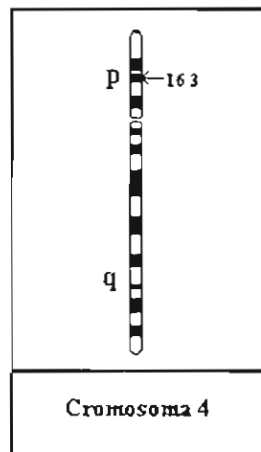


Figura. 11. Localización del gen causante de la enfermedad de Huntington.

La expansión CAG causante de EH se localiza en el exón 1 y codifica para un segmento de 17 residuos de poliglutamina a partir del extremo amino terminal. Los individuos con menos de 35 repetidos no presentan la enfermedad, con 35 a 39 pueden presentarla, con 40 a 60 presentan EH en la vida adulta y con más de 60 repetidos la desarrollan antes de los 20 años.

La mutación produce una proteína alterada en un mayor número de glutaminas.(The Huntington's disease collaborative research group 1993; Bates1993; Paulson HL and Fishbeck 1996; Burreight 1997)

2.8. Haloperidol

Este fármaco se usó inicialmente en la enfermedad de Huntington para el tratamiento de la psicosis asociada, pero más tarde se encontró que mejoraba también la corea. Ahora es el fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Huntington, junto con antidepresivos tricíclicos y algunos inhibidores de la recaptura de serotonina como la paroxetina y todos son metabolizados por *CYP2D6*. El haloperidol es un excelente antipsicótico y también puede disminuir la corea hasta cierto punto. No es efectivo para el tratamiento del trastorno de la marcha de la enfermedad de Huntington. El haloperidol se clasifica como un medicamento de alta potencia, con mayor efecto extrapiramidal (16%) y ventana terapéutica alta, pero con pocos efectos anticolinérgicos y menor riesgo ocular, hepático y hematológico. (Cedric y cols 1998)

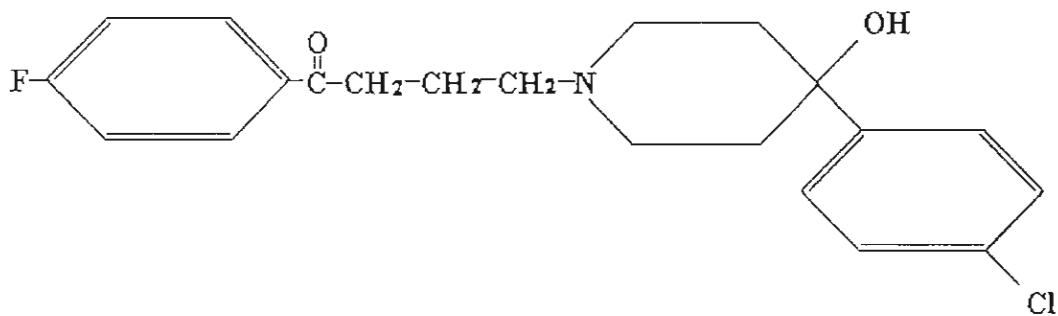


Figura 12. Estructura química del haloperidol (Tomado de Belvan y cols. 1982)

Sintetizado originalmente por Janssen, este compuesto consiste en un anillo fenil cetónico con una cadena lateral recta de propileno y un núcleo de piperidina. En la posición para el anillo fenilo cetónico, existe un átomo de flúor, sustituyente, y un grupo alcohol terciario con anillo fenílico está en posición 4 del núcleo piperidínico, como elemento de sustitución. Pertenece al grupo de las llamadas butirofenonas. El haloperidol, aunque tiene estructura diferente, se asemeja a las fenotiacinas piperacínicas por su acción antipsicóticas (Belvan y cols. 1982).

Mecanismo de acción

El bloqueo de los receptores centrales de dopamina es el mecanismo de acción por medio del cual se cree que actúa el haloperidol para el tratamiento de la psicosis y la corea de la enfermedad de Huntington. Se supone que estas dos acciones son causadas por un exceso relativo de dopamina central (Cedric y cols. 1998).

Farmacocinética

El haloperidol tiende a seguir patrones erráticos e impredecibles de absorción en particular después de la administración oral o incluso cuando se utilizan preparados líquidos. Los niveles plasmáticos alcanzan su máximo de dos a seis horas después de la ingestión del fármaco y permanecen elevados por unas 72 horas. La administración parenteral incrementa entre 4 y 10 veces la biodisponibilidad del fármaco activo. El haloperidol es muy lipófilico y se fija en gran medida en las membranas o en proteínas, y se acumula en cerebro, pulmón, y otros tejidos que cuentan con un riego sanguíneo rico, también entra en la circulación fetal y en la leche materna. La concentración mayor del producto aparece en el hígado y en promedio 15% de una dosis dada se excreta en la bilis. Aproximadamente 40% de una sola dosis se excreta por los riñones en los primeros cinco días (Riker y cols, 1994).

La farmacocinética que sigue el haloperidol es de tipo multifásico. Reduce el tránsito y el vaciado gástrico, pudiendo alterar la absorción de otros medicamentos administrados concomitantemente. El metabolismo es hepático, con un metabolito de menor actividad, haloperidol reducido, que a su vez es reconvertido en haloperidol (Beresford y Ward, 1987). Esto explica que en algunos casos la vida media del haloperidol sea mayor a las 100 horas (Ereshefsky y cols, 1984). El MTPT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) es un compuesto que se transforma en N-metil-4-fenilpiridio, un compuesto neurotóxico que actúa sobre las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la sustancia nigra. El haloperidol es de estructura similar al MPTP y se oxida a tetrahidropiridio haloperidol, éste a su vez se convierte en haloperidol dihidropiridio y finalmente se forma el haloperidol piridio, un compuesto igualmente neurotóxico. Así, cuando se utiliza el haloperidol a largo plazo se corre el riesgo de provocar un efecto neurotóxico sobre las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la sustancia nigra (Klaasen, 1996).

Farmacodinamia

La vía IV produce menor número de efectos adversos de tipo extrapiramidal, aunque esto podría deberse a la administración concomitante de benzodiazepinas y beta-bloqueadores en diversos estudios (Menza, 1987; Sanders 1989). Esta presentación también puede usarse en forma de infusiones continuas (3 a 25 mg/hora) en caso de pacientes agitados críticamente enfermos, con poco riesgo de complicaciones, las cuales son muy ocasionales: temblor, arritmia auricular con bloqueo de tercer grado intermitente y prolongación del QT y taquidardia ventricular (Riker y cols, 1994).

Dosis

El haloperidol se presenta en tabletas de 0.5, 1, 2 y 5mg y como una solución incolora e insípida que contiene 2mg/mL. También se presenta en ampollas de 5mg (1mL) para uso en vía intramuscular IM e IV. Para iniciar el tratamiento se emplean dosis de 1 a 4mg/día divididas en dos. Rara vez son necesarias dosis de más de 10 a 20mg/día. En general se requiere menos cantidad del fármaco a medida que la enfermedad progresa, porque la severidad de la corea disminuye con el tiempo (Cedric y cols, 1998).

Interacciones Medicamentosas

Los antidepresivos tricíclicos como, propranolol, bupiriona, cimetidina y fluoxetina (por competición por las enzimas del CYP2D6) fenitoína, y carbamazepina incrementan el metabolismo del haloperidol por inducción de la CYP3A y posiblemente la CYP2B (Linnoila, 1980; Jann, 1985). El alcohol, aumenta el efecto depresor del sistema nervioso central y el riesgo de discinesias. Los cigarrillos bajan la concentración de antipsicóticos. El litio más haloperidol aumenta las posibilidades de síndromes extrapiramidales (Cedric y cols, 1998).

Metabolismo

El haloperidol es extensamente metabolizado en el hígado y solo un 1% de la dosis administrada es excretada de forma inalterada en la orina (Forsman, 1977). La biotransformación incluye glucoronidación (de 50 a 60%) y oxido-reducción. (23%), también hay una N-dealquilación formando el metabolito piridinium (de 20 a 30%) (Someya, 1992, Kudo, 1999). El metabolito de la glucoronidación es inactivo, mientras que el haloperidol reducido tiene efectos farmacológicos (por ejemplo: gran afinidad por los receptores opioides y receptores dopaminérgicos D_2 y D_3) (Jaen, 1993).

La formación del haloperidol reducido es mediada por la carbonil reductasa. El haloperidol reducido es parcialmente oxidado a haloperidol. *In vitro* esta reacción es mediada por el citocromo P450 (CYP) 3A4, solo un grupo de autores ha reportado la intervención de la CYP2D6 (Pan, 1998, Fang, 1997).

Farmacogenética del haloperidol

El haloperidol es un fármaco que es un sustrato importante de la CYP2D6 (solo ha concentraciones bajas). Llerena y cols (1992) administraron dosis orales simples de haloperidol a un panel de seis individuos EM y seis PM de debrisoquina. La eliminación del haloperidol en los PM fue significativamente más lenta comparada con los EM, la vida media ($t_{1/2}$) en plasma fue más larga (29.4 y 16.3h, respectivamente, con una $P < .01$) y el tiempo de aclaramiento fue más lento (1.16 y $2.49 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectivamente, con una $P < .05$). Por otro lado en un estudio clínico realizado en 8 pacientes caucásicos con esquizofrenia tratados con haloperidol (decanoato de haloperidol) se determinó la ocupación del receptor D_2 de dopamina mediante una tomografía de emisión de positrones en las semanas 1 y 4 semanas después de la inyección intramuscular del fármaco. Uno de los pacientes resultó ser genotípicamente PM para debrisoquina y presentó la concentración plasmática más elevada de haloperidol así como la ocupación más alta del receptores D_2 (Nyberg y cols, 1995).

En dos estudios en Japón se demostró la relación entre concentraciones plasmáticas altas de haloperidol y la presencia de los alelos *CYP2D6* *10 y *5, en pacientes tratados con dosis orales de 12mg diarios de haloperidol. (Susuki y cols, 1997; Mihara y cols,

1999). En un estudio reciente en Corea se estableció una relación entre la concentración de haloperidol y el genotipo de CYP2D6 en pacientes que recibieron una dosis oral menor de 20mg diarios, pero no en pacientes que recibieron dosis más altas. Estos resultados sugieren que la CYP2D6 de alta afinidad y baja capacidad es la enzima predominante a bajas concentraciones de dosis de haloperidol, mientras que la CYP3A4 con mayor capacidad y menor afinidad se vuelve más importante a dosis altas, con lo que se concluyó que a bajas concentraciones de haloperidol la enzima encargada del metabolismo es la CYP2D6 (Roh y cols.). La ruta metabólica del haloperidol catalizada por la CYP2D6 es aún desconocida. Otros neurolépticos tales como: perfenazina, risperidina, tioridazina, y zuclopentoxiol también son metabolizados por CYP2D6.

2.9. Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio farmacogenómico del *CYP2D6*

2.9.1. Purificación de DNA

En la actualidad existen diversos métodos para aislar ácidos nucleicos: por ejemplo, métodos orgánicos, salinos, alcalinos, por enzimas proteolíticas, etc. Todos ellos involucran tres pasos básicos: 1) Lisis de leucocitos, células que contienen el material genético, mediante la utilización de amortiguadores de lisis; 2) Eliminación de componentes celulares no deseados; 3) Obtención de DNA mediante la precipitación alcohólica. La purificación de ácidos nucleicos es una técnica muy importante en genética y biología molecular, que en conjunto con otras, ha permitido el conocimiento de la estructura, función y regulación de los genes (Sambrook y cols, 1989; Davis y cols, 1986).

2.9.2. Cuantificación de DNA

Existen dos métodos muy usados para medir la cantidad de ácidos nucleicos en una muestra de DNA. Si la muestra es pura (es decir que no tiene cantidades significativas de impurezas como: proteínas, fenol u otros ácidos nucleicos), la cuantificación se realiza por espectrofotometría. Si la muestra es muy pequeña o contiene cantidades significativas de impurezas, la cuantificación puede ser estimada mediante una electroforesis con bromuro de etidio (Sambrook y cols, 1989).

a) Cuantificación por Espectrofotometría: las purinas y pirimidinas libres son compuestos débilmente básicos y por ello se denominan bases. Poseen una serie de propiedades químicas que afectan a la estructura y, en último término, la función de los ácidos nucleicos. Las purinas y pirimidinas presentes en el DNA son moléculas altamente conjugadas. Estas propiedades tienen efectos importantes sobre la estructura, la distribución electrónica y la capacidad de absorción de la luz UV de los ácidos nucleicos. La resonancia entre los átomos del anillo hace que la mayoría de los enlaces tengan el carácter de doble enlace parcial. Como consecuencia de este hecho, las pirimidinas son moléculas planas y las purinas son casi planas, con una ligera torsión. Además como un resultado de la resonancia, todas las bases absorben luz UV, y los ácidos nucleicos se caracterizan por tener gran absorción a una longitud de onda de 260nm (Lehninger, 2001).

Para cuantificar DNA se deben leer las muestras a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en una muestra; y la lectura a 280 nm indica si existen proteínas en la muestra. Una DO (densidad óptica) corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de DNA de doble cadena. La razón entre las lecturas de DO_{260}/DO_{280} proporcionan una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8 – 2.0. Si el DNA está contaminado con proteínas o fenol, el valor de la razón DO_{260}/DO_{280} es significativamente bajo o por encima del valor normal. Por lo cual no se puede calcular la concentración de DNA con exactitud (Sambrook, 1989).

b) Cuantificación por emisión de fluorescencia con bromuro de etidio: algunas veces la cantidad de DNA no es suficiente (<250 ng/ml) para ser analizadas por espectrofotometría, o el DNA puede tener un exceso de impurezas que absorben luz UV. Un método rápido para tener una perspectiva de DNA en una muestra es realizar una electroforesis con bromuro de etidio. El bromuro de etidio se intercala en las bases del DNA, emitiendo fluorescencia por inducción con luz UV. Por lo cual se puede tener una perspectiva de la cantidad de DNA en la muestra comparando la fluorescencia producida por la muestra, contra la de un marcador de pesos moleculares que posee un patrón de bandas con pesos específicos y conocidos (Sambrook, 1989; Innis y cols, 1990).

2.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida mundialmente por las siglas PCR (por *Polymerase Chain Reaction*), fue desarrollada a principios de la década de los ochentas por Mullis y sus colaboradores [Mullis, 1990], en la empresa Cetus Corporation.

La PCR es una metodología que se basa en el principio de amplificar un fragmento de DNA en forma ilimitada en unas cuantas horas, esto se logra mimetizando el fenómeno de replicación del DNA *in vivo*. Para lograr la meta de la PCR se requiere de DNA de interés (puede ser DNA genómico o bien cDNA), los oligonucleótidos (por lo general se diseñan según la secuencia de la región a amplificar, y son fragmentos de 20-30 nucleótidos complementarios a las cadenas del DNA que se unen en extremos contrarios, uno en la cadena líder que va de 5' a 3' y el otro en la cadena complementaria que va de 3' a 5'), los dNTP's (deoxinucleótidos trifosfato, donde los nucleótidos son adenina, guanina, citosina y timina), y DNA polimerasa que sea termoestable (La necesidad de contar con una enzima que soportara temperaturas de hasta 95°C, hizo pensar en microorganismos termófilos, por lo que se usa en la actualidad *Taq* polimerasa que es obtenida de *Thermus aquaticus*) (Strachan y Read., 1998).

En la reacción de PCR son utilizados también amortiguadores (como cosolventes) y algunos minerales como cofactores (ej. Mg^{++}) (Rolf y cols., 1992).

El procedimiento de amplificación está compuesto de 3 fases, donde la primera consiste en la desnaturalización del DNA cuando es de cadena doble, esto se consigue exponiendo al DNA a temperaturas de 93-95°C. Después sigue la hibridación. Es esta fase la que confiere una alta especificidad a la PCR. Aquí los oligonucleótidos se alinean solamente a la región complementaria a ellos. Generalmente se utilizan iniciadores de 18 a 22 pares de bases, porque con este tamaño la probabilidad de

encontrar más de una secuencia complementaria es altamente remota. La temperatura para la fase de hibridación varía según la longitud y secuencia de los iniciadores (T_m) (Rofls y cols., 1992).

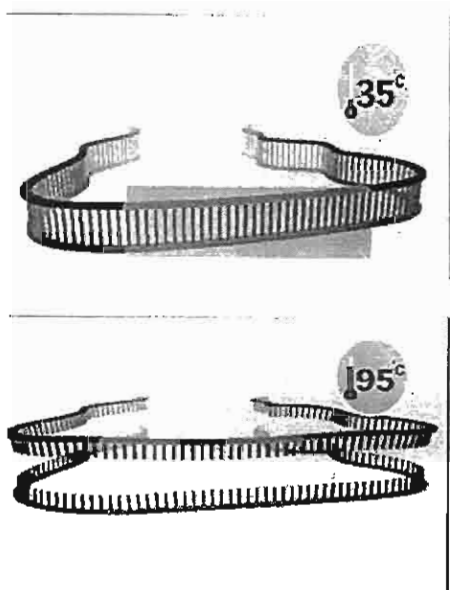
La tercera fase comprende la polimerización, es decir donde la DNA polimerasa agrega al iniciador las bases (los dNTP's) a la cadena complementaria. La temperatura a la cual se lleva a cabo la polimerización comprende 72°C , por ser la temperatura óptima de función de las DNA polimerasas.

La PCR consiste en la repetición de estas 3 fases o bien en ciclos. Así un ciclo está compuesto de estas 3 fases. Actualmente los protocolos indican: (Bobadilla y Gamba, 1996).

- Desnaturalización $92-95^\circ\text{C}$, 10 min
 - Desnaturalización $92-95^\circ\text{C}$, 30 seg
 - Hibridación T_m (según la T_m del primer) 30 seg.
 - Polimerización 72°C 30 seg
 - Polimerización 70°C 10 min
 - Temperatura final 4°C
- } 30 ciclos

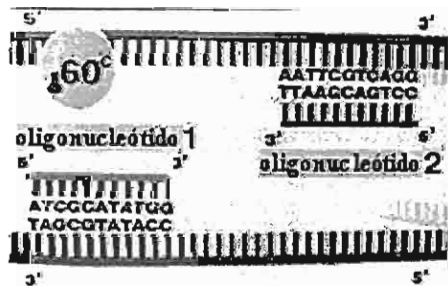
En la practica clínica la PCR es útil en los padecimientos en los que el análisis de un fragmento génico es relevante en las enfermedades hereditarias en donde el análisis detallado del gen en cuestión es el fundamento del diagnóstico, las infecciones, en donde la amplificación del material génico o viral provee al clínico con información valiosa en el diagnóstico, en el pronóstico y la respuesta terapéutica; y en las neoplasias malignas, en donde la amplificación de oncogenes y otras proteínas asociadas con el cáncer se convertiría en un valioso marcador de predisposición (Herrera y Gamba, 1996).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

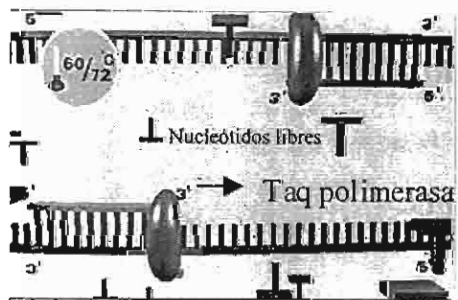


Inicialmente, se tiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar (sección marcada).

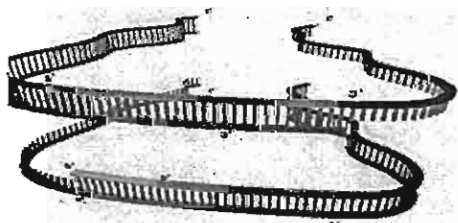
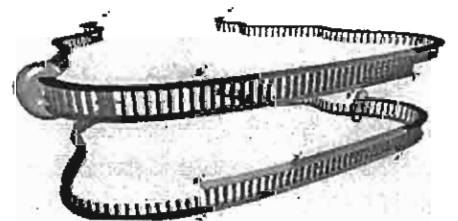
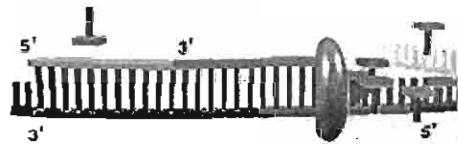
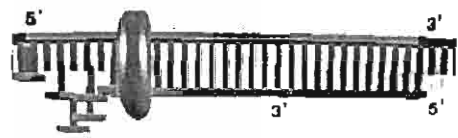
El primer ciclo comienza llevando la temperatura a 90-95°C, el DNA se desnatura, y los puentes de hidrógeno que unen una cadena con otra se rompen generando 2 cadenas sencillas complementarias



En el segundo paso del primer ciclo, la temperatura desciende a 60°C, para que los oligonucleótidos se puedan alinear en extremos opuestos, y a su secuencia complementaria.



En el tercer paso del primer ciclo, la temperatura se eleva a 72°C, a esta temperatura, la Taq polimerasa, emplea los nucleótidos libres, para agregarlos de manera complementaria a la cadena.



Así al final de la elongación de la cadena, tenemos 2 fragmentos grandes que contienen cada uno una copia de la secuencia de interés

5'  3'

3'  5'

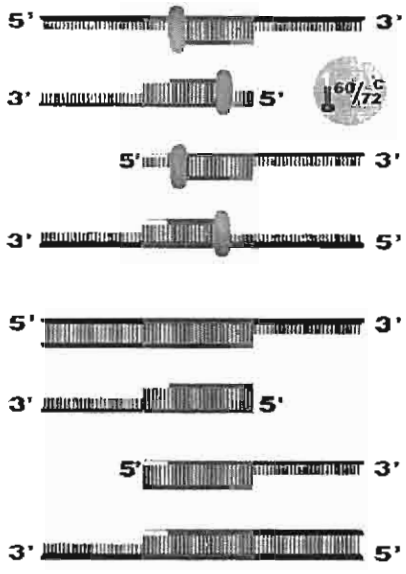
5'  3'

3'  5'

El segundo ciclo inicia, se vuelve a elevar la temperatura a 90-95°C, y las cadenas se abren.



Nuevamente, los oligonucleótidos se anclan en sus respectivos sitios cuando la temperatura desciende a la T_M del primer

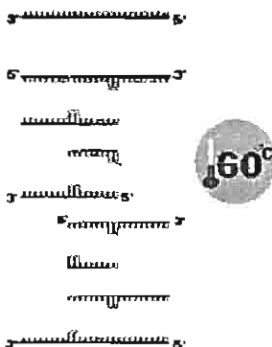


De nueva cuenta, a 72°C , la Taq polimerasa, elonga las cadenas sencillas, agregando los nucleótidos correspondientes. Al final del segundo ciclo tenemos 4 cadenas dobles, donde se encuentra insertada la secuencia de interés

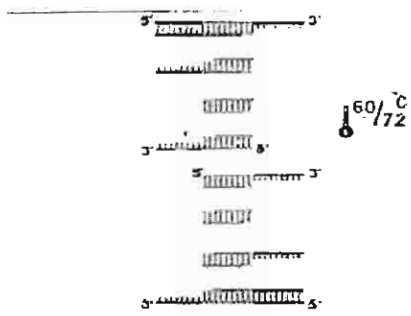


Ciclo 3, paso 1, desnaturalización.

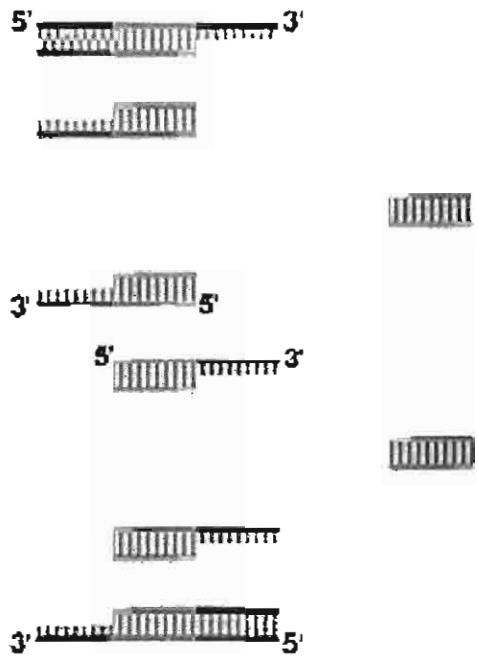
Inicio del ciclo 3



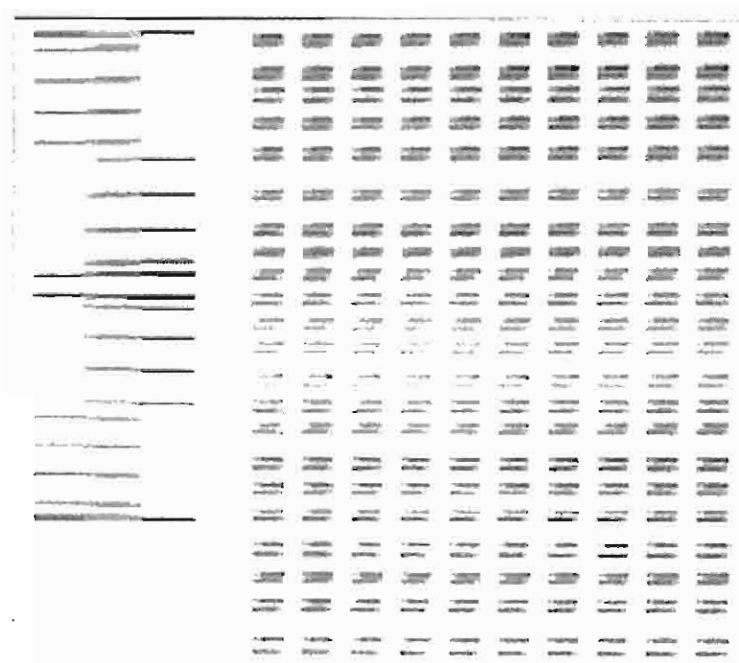
Ciclo 3 paso 2, alineamiento de los primers



Ciclo 3 paso 3, elongación de la cadena.



Al final del ciclo 3, tenemos 2 fragmentos cortos que contienen la secuencia de interés, y 6 fragmentos largos que también contienen la secuencia de interés.



Al final de 30 ciclos, tenemos las suficientes copias de la secuencia de interés (aproximadamente 1, 073, 741, 766 copias de la secuencia de interés).

Figura. 13. Reacción en cadena de la polimerasa. (Tomado de Herrera y Gamba, 1996).

2.9.4. Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción (ER) son proteínas que reconocen secuencias concretas del ADN, denominadas dianas de restricción y tienen actividad de endonucleasas (cortan la doble hélice del ADN). Existen distintos tipos de ER según sea el tipo de secuencia reconocida y el lugar de corte. Las que tienen una aplicación más generalizada en el diagnóstico molecular son las de tipo II, que reconocen secuencias palindrómicas de entre 4 y 8 nucleótidos (secuencias que se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) y cortan el ADN en dicha secuencia (Figura 14). (<http://www.biopuc.cl/cursos/bio288/clase2.htm>.)

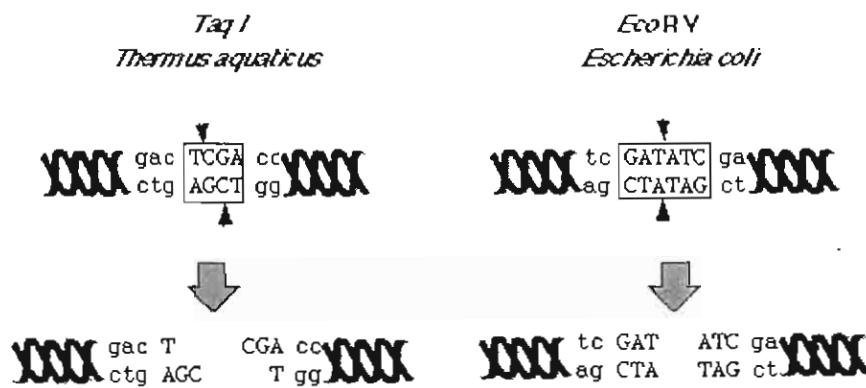


Figura. 14. Actividad endonucleasa de las ER Taq I y EcoR V.
Tomado de (<http://www.biopuc.cl/cursos/bio288/clase2.htm>)

En el Figura 14 se presenta la actividad endonucleasa de las ER Taq I (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) y EcoR V (obtenida de la enterobacteria *Escherichia coli*). Ambas enzimas tienen especificidad para la secuencia reconocida (diana) y cortan a la misma liberando fragmentos con extremos cohesivos o romos respectivamente. Este tipo de enzimas tiene una total especificidad por la secuencia diana y el cambio de un solo nucleótido en ésta produce la pérdida de reconocimiento. Las mutaciones debidas a variaciones nucleotídicas o las pequeñas deleciones o inserciones pueden producir la pérdida de una diana o la aparición de una nueva diana donde antes del cambio ésta no existía (<http://www.biopuc.cl/cursos/bio288/clase2.htm>).

2.9.5. Separación electroforética de ácidos nucleicos

El método más común y eficaz de fraccionar moléculas de ADN en función de su tamaño es la electroforesis en soporte de agarosa o acrilamida. En ambos casos las moléculas de ADN (o ARN) se aplican a una matriz semisólida, generalmente un polímero de agarosa o acrilamida, que actúa como cedazo restringiendo el paso de las moléculas en función de su tamaño. La electroforesis se realiza en un tampón a pH básico de forma que las moléculas de ADN están cargadas negativamente. Para inducir el desplazamiento a través de la matriz se aplica un campo eléctrico y las moléculas se desplazan hacia el polo positivo, en la Figura 15 se esquematiza este método de separación. Dado que la carga neta de cada molécula es la misma, sea cual sea su tamaño, el único parámetro discriminatorio es el tamaño del poro de la matriz utilizada. El resultado final es la separación de las moléculas de ADN en función de su tamaño.

Las moléculas más pequeñas pasarán más fácilmente a través del poro mientras que las grandes quedarán retenidas. La muestra se aplica próxima al polo negativo y migra hacia el polo positivo. Los fragmentos grandes de ADN quedan retenidos en su migración al pasar con mayor dificultad a través del poro. Los fragmentos más pequeños alcanzan el extremo final del gel, pasando con facilidad a través de los poros (<http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/Documen00/klein/TEMA15.htm>).

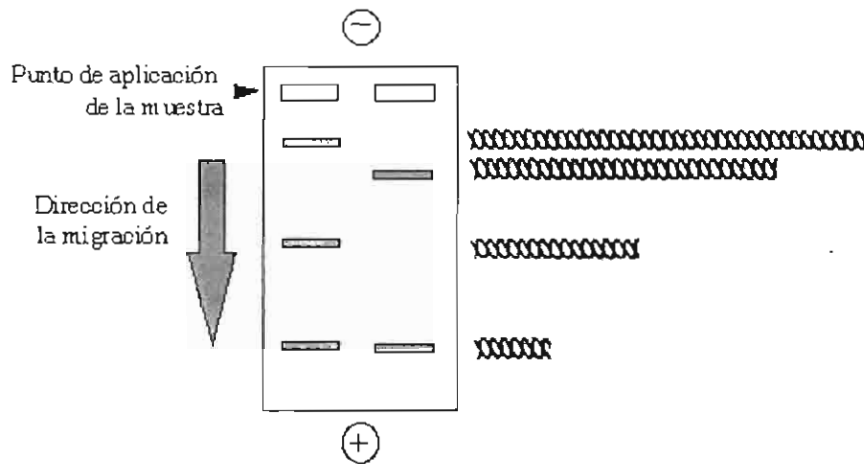


Figura. 15. Separación electroforética de ácidos nucleicos.

(Tomado de <http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/Documen00/klein/TEMA15.htm>)

3 Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar los alelos *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4* en una muestra de pacientes de población mexicana con diagnóstico de enfermedad de Huntington, estudiados en el INNN Manuel Velasco Suárez.

3.2. Objetivos particulares

Caracterizar el tipo de polimorfismo de *CYP2D6* en pacientes con enfermedad de Huntington.

Correlacionar los datos genotípicos de *CYP2D6* con el tratamiento con haloperidol, para sugerir una farmacoterapia individualizada

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Material

4.1.1. Pacientes

Se estudió una muestra de 70 pacientes con diagnóstico de enfermedad de Huntington confirmado a nivel molecular de población mexicana. El rango de edad fue entre 30 y 65 años, hijos y nietos de mexicanos, todos los individuos firmaron carta de consentimiento informado.

4.1.2. Reactivos

➤ Agua desionizada	➤ Fenol saturado
➤ Alcohol isoamílico	➤ Ficol tipo 400
➤ Azul de bromo fenol	➤ Hidroxiquinoleina
➤ Agarosa (grado electroforético)	➤ Isopropanol
➤ Acrilamida (grado electroforético)	➤ MgCl ₂
➤ Ácido cítrico – dextrosa (ACD)	➤ NaCl
➤ Ácido bórico	➤ NaOH
➤ Ácido etiléndiamintetracético (EDTA)	➤ N-N'-metilén-bis-acrilamida
➤ Bromuro de etidio	➤ Persulfato de amonio
➤ β-Mercapto etanol	➤ TRIZMA base
➤ Cloroformo	➤ TEMED
➤ Dodecilsulfato de sodio (SDS)	➤ Xilencianol FF
➤ Etanol absoluto	

4.1.3. Equipo

➤ Balanza analítica (OHAUS)
➤ Baño maría con agitación (Cole Parmer)
➤ Bomba de vacío Modelo 1500
➤ Campana de extracción de flujo laminar (VECO)
➤ Cámara de electroforesis vertical VI6
➤ Cámara de electroforesis horizontal (HORIZON 58)
➤ Centrífuga (BECKMAN GS-6R)
➤ Equipo fotográfico (POLAROID DS 34)
➤ Espectrofotómetro (BECKMAN DU-40)
➤ Fuente de poder 3000 (POWER/PAC BIO RAD)
➤ Horno de microondas (SHARP)
➤ Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R)
➤ Microcentrífuga (QUALITRON)
➤ pH metro (BECKMAN)
➤ Termociclador (Eppendorf)
➤ Transiluminador de luz UV (Cole Parmer)

4.2. Metodología

Las técnicas que se emplearon para realizar el presente trabajo están representadas en el siguiente esquema.

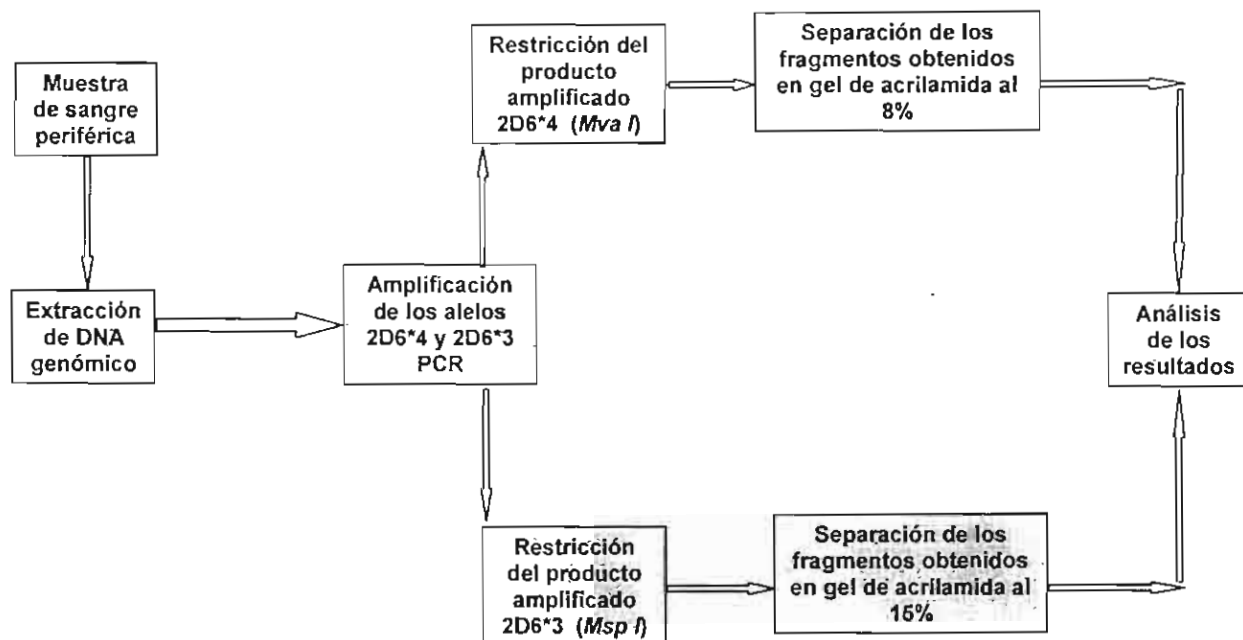


Figura 16. Diagrama que muestra de forma esquemática el proceso de identificación de los alelos *CYP2D6* *3 y *4.

4.2.1. Obtención de la muestra de sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Huntington.

Las muestras empleadas para el presente estudio se obtuvieron de dos fuentes principalmente, la primera fue del banco de DNA del Departamento de Genética del INNN y la otra de pacientes con EH que acudieron a consulta externa en este instituto durante 2002-2003. A cada paciente se le informó del estudio y una vez que firmó carta de consentimiento se le tomó una muestra de sangre periférica de 20ml utilizando tubos con ácido cítrico-dextrosa. El citrato se une al ión calcio (Ca^{++}) formando complejos solubles y protege a los procoagulantes lábiles, inhibiéndose el factor IV de la cascada de coagulación. La dextrosa cumple la función de conservador y permite que la sangre

se pueda almacenar hasta por 7 días en refrigeración sin que se alteren las estructuras celulares contenidas en la sangre.

4.2.2. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó por la técnica de sales y fenol-cloroformo o mediante un estuche comercial de la marca Quiagen.

a) Técnica de sales y fenol-cloroformo.

A partir de la sangre periférica, se separaron los leucocitos por centrifugación a 5000 rpm/4°C/10min, se lisaron los eritrocitos con amortiguador de lisis de células rojas (RCLB), hasta obtener un botón de leucocitos. Posteriormente mediante una solución salina (NaCl), se alteró la permeabilidad de la membrana celular permitiendo que ésta se rompiera y liberara el DNA que posteriormente se purificó con extracciones de fenol saturado (el cual tiene como función eliminar proteínas y restos celulares), fenol-cloroformo (elimina residuos de fenol saturado) y por último cloroformo isoamílico (elimina residuos de fenol-cloroformo). Al final el DNA se precipitó con isopropanol y se reconstituyó en agua estéril inyectable.

b) Extracción mediante el estuche comercial QUIAGEN.

1. A partir de la muestra de sangre periférica, se tomaron 2 mL y se mezclaron con 2.4 mL de amortiguador AL y 200 µL de proteasa QUIAGEN. La mezcla se agitó y se incubó a 70°C durante 10 minutos.
2. Posteriormente se agregaron 2 mL de etanol (96-100%) y mezclaron nuevamente
3. Se transfirieron 3.3 mL de la mezcla a una columna (QIAamp Midi Colum) y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a 20°C
4. Se desechó el filtrado y el remanente se centrifugó
5. Una vez que se terminó este proceso, se agregó a la columna 2 mL de amortiguador AW1 y se centrifugó a 5000 rpm/2 minutos y finalmente se agregaron 2 mL de amortiguador AW2 en la misma columna, centrifugándose a 5000 rpm/15 minutos
6. La columna se colocó en otro tubo limpio y estéril en el que se le adicionó 300 µL de amortiguador AE o agua destilada. Se dejó a

-
- temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm/5 minutos
 7. Para obtener una concentración de DNA máxima, se colocó nuevamente el contenido de DNA en la membrana y se centrifugó
 8. El material de DNA genómico se rotuló y almacenó a 4°C (QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit Handbook 09/2001)

4.2.3. Cuantificación de DNA genómico

Una vez obtenido el DNA genómico, éste se cuantificó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 0.05%. Se puede realizar una estimación de la pureza del DNA mediante la razón entre las lecturas de 260nm y 280nm. La otra prueba utilizada fue la electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio que se empleó para observar la integridad de DNA en las muestras y la cantidad del mismo. El peso molecular del DNA en las muestras se estima por comparación con la migración de un marcador de peso molecular que posee un patrón de bandas con pesos moleculares específicos y conocidos.

4.2.4. Genotipificación de CYP2D6 *3 y *4

Para la realización de la genotipificación de los alelos *3 y *4 se emplearon las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguida de digestión con enzimas de restricción específicas (PCR-RFLP). La combinación de ambas técnicas permitió determinar el genotipo silvestre, heterocigoto y homocigoto mutante para cada uno de los alelos.

La técnica de PCR se utilizó para amplificar una región del exón 5 del gen *CYP2D6*. Esta técnica se llevó a cabo mediante ciclos repetitivos de tres eventos; desnaturalización, alineación y extensión a diferentes temperaturas.

La amplificación de ambos alelos *CYP2D6* *3 y *4 se realizó de acuerdo a la publicación de Schur y cols (2001) con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos específicos para el alelo *CYP2D6* *3 usados son: 2D6*3 A (5'- GAT GAG CTG CTA ACT GAG CCC-3') Y 2D6*3 B (5'- CCG AGA GCA TAC TCG GGA C-3') y para el alelo *CYP2D6* *4 fueron 2D6*4 A (5'- GCC TTC GCC AAC CAC TCC G -3') 2D6*4 B (5'- AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC -3')

Para el alelo *CYP2D6* *3 cada mezcla de reacción de PCR contuvo DNA genómico (300ng/μl); los oligonucleótidos 2D6*3 A y 2D6*3 B (200ng/μl), amortiguador adicionado con MgCl₂ (15mM), dimetil sulfóxido (5%), dNTP's (5U/μl) y la Taq DNA polimerasa (0.4μl), en un volumen de reacción de 30μl. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador, bajo el siguiente protocolo: desnaturalización 94°C/5min; 40 ciclos de tres pasos cada uno; Desnaturalización a 94°C/1min, alineación de

oligonucleótidos a 58°C/1min, y extensión a 72°C/5min, extensión final a 72°C/10min. Posterior a la amplificación los productos obtenidos se digirieron con 2.0 unidades de la enzima de restricción *Msp I* (10U/μl) a 37°C durante 3 horas. Esta enzima reconoce la secuencia de CCGG, cortando entre las dos citosinas. (Figura 17).

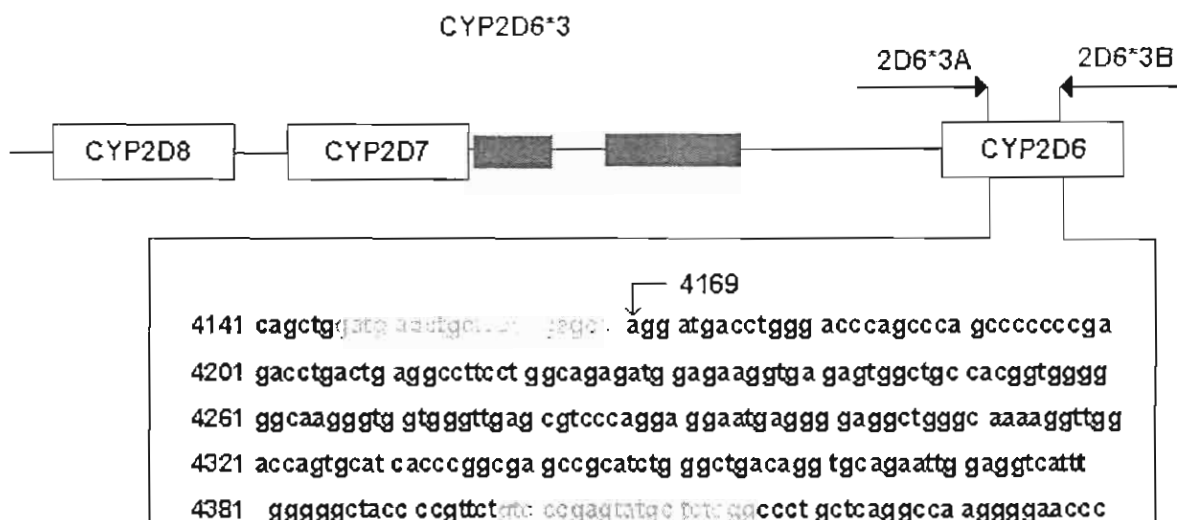


Figura 17. Secuencia amplificada del alelo *CYP2D6*3* con un total de 270 pares de bases. Las secuencias en verde representan los oligonucleótidos que flanquean la región de interés. La secuencia ccgg (en rojo) representa el sitio de corte específico de la enzima *MspI*. La adenina (a) en la posición 4169 representa la mutación característica de este alelo, que consiste en la delección de la misma, generándose un sitio de reconocimiento en donde actúa la enzima de restricción.

Para el alelo *CYP2D6*4* cada mezcla de reacción de PCR contuvo DNA genómico (300ng/μl); los oligonucleótidos 2D6*4 A y 2D6*4 B (200ng/μl); amortiguador adicionado con MgCl₂ (15mM); dimetil sulfóxido (5%); dNTP's (5U/μl) y Taq DNA polimerasa (0.4μl), en un volumen de reacción de 30μl. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador, bajo el siguiente protocolo: desnaturalización 94°C/5min; 30 ciclos de tres pasos cada uno; desnaturalización a 94°C/1min, alineación de oligonucleótidos a 58°C/1min, y extensión a 72°C/5min, extensión final a 72°C/10min. Posterior a la amplificación los productos obtenidos se digirieron con 2.0 unidades de la enzima de restricción *Mva I* (10U/μl) a 37°C durante 2 horas. La enzima reconoce la secuencia de CCAGG, cortando entre la adenina y la guanina. (Figura 18)

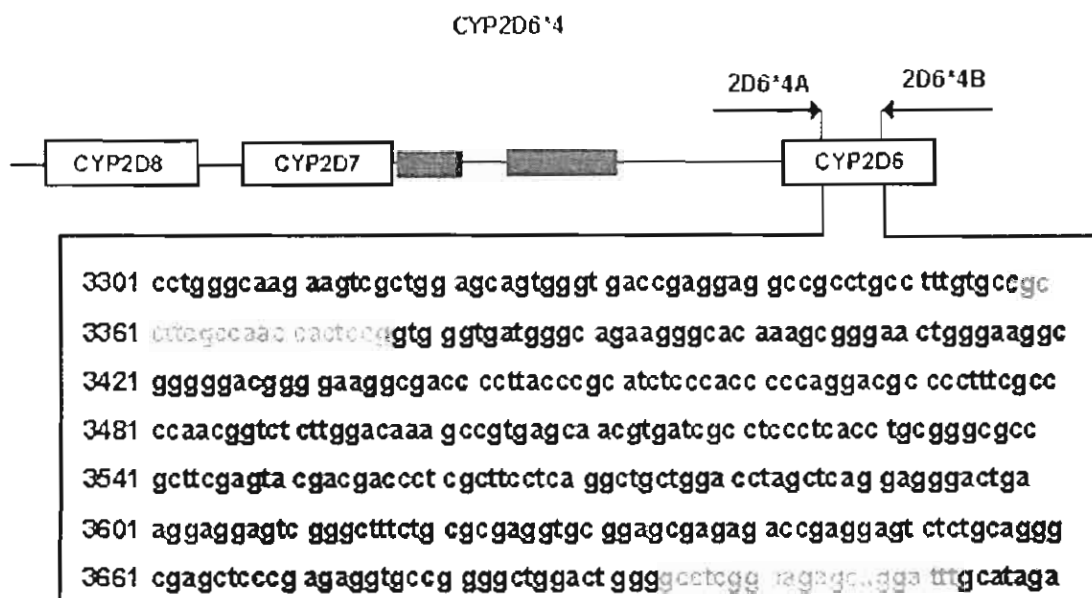


Figura 18. Secuencia amplificada del alelo CYP2D6*4 con un total de 350 pares de bases. Las secuencias en color verde representan los oligonucleótidos que flanquean la región de interés. La secuencia CCAGG representa el sitio de corte específico de la enzima *Mva I*. La guanina (G) en la posición 1934 representa la mutación característica de este alelo, que consiste en la sustitución de una G por una A.

4.2.5. Electroforesis

Una vez obtenida la secuencia *CYP2D6* *3 a través de la amplificación y digestión mediante la *Msp I*, se analizó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 15%, durante 3 horas a 270V. El gel se tiñó con bromuro de etidio para revelar la localización del DNA en el gel. El tamaño de las bandas generadas por la enzima *Msp I* se estimó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular pBR322 digerido con *Hae III*.

De manera similar, una vez obtenida la secuencia *CYP2D6* *4 a través de la amplificación y digestión mediante la enzima *Mva I* se analizó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8%, durante 2:30 horas a 270V. El gel se tiñó con bromuro de etidio para revelar la localización del DNA en el gel. El tamaño de las bandas generadas por la enzima *Mva I* se estimó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular pBR322 digerido con *Hae III*.

4.2.6. Análisis de genotipos *3 y *4

La figura 19 representa los 6 genotipos esperados para los alelos *3 y *4 y el patrón de bandas correspondiente para cada genotipo. Estos patrones se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de bandas específicas cuyo peso molecular se compara con la primera columna (M), que representa al marcador de peso molecular.

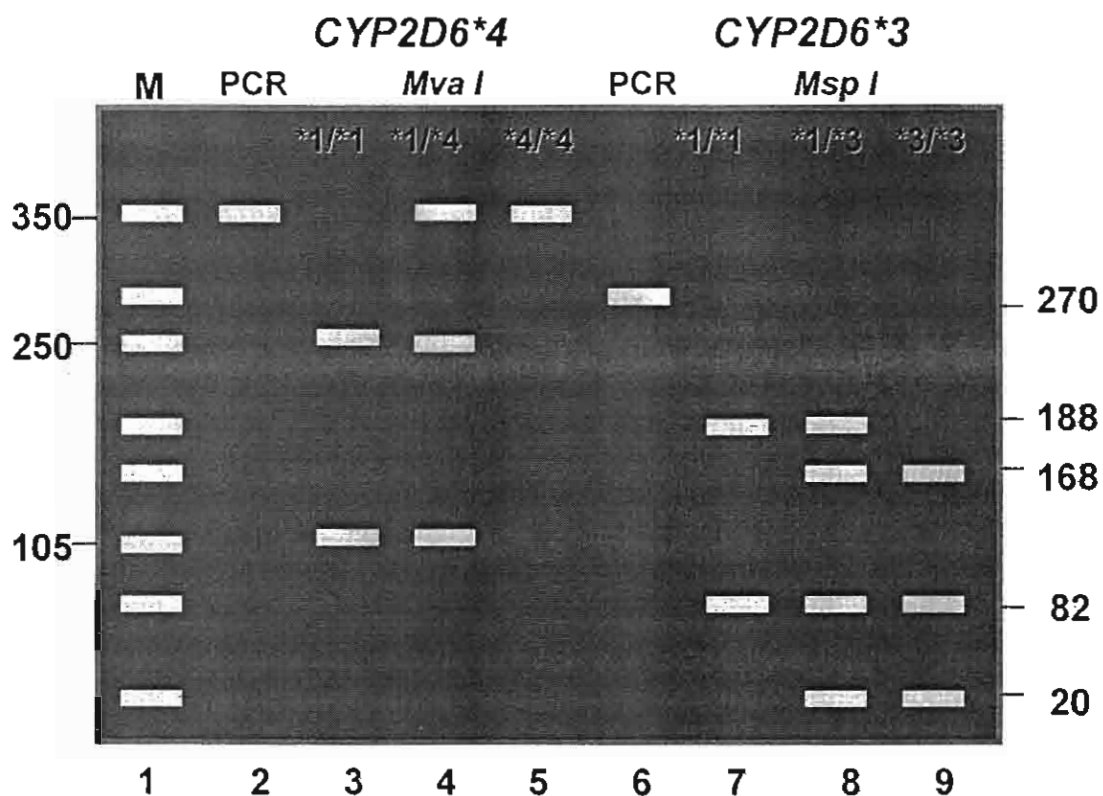


Figura 19. Genotipos de los alelos *4 y *3, respectivamente. Carril 1 marcador de peso molecular (M), carril 2 producto amplificado para el alelo *4; carril 3 genotipo homocigoto normal *1/*1; carril 4 genotipo heterocigoto *1/*4; carril 5 genotipo homocigoto mutado *4/*4; carril 6 producto amplificado para el alelo *3; carril 7 genotipo homocigoto normal *1/*1; carril 8 genotipo heterocigoto *1/*3 y carril 9 genotipo homocigoto mutado *3/*3.

5P Resultatus

5. RESULTADOS

5.1. Amplificación de DNA

En todas las muestras de DNA genómico se incluyó una “muestra blanco” sin DNA genómico para poder comprobar si no había contaminación. Una vez obtenidos los productos de PCR, se observaron en geles de agarosa al 3%; si la “muestra blanco” no presentaba alguna otra banda además de las correspondientes a los oligonucleótidos, significaba que no había contaminación y por lo tanto, las muestras sólo exhibían las bandas de DNA amplificado de interés.

5.2. Tipificación del alelo *CYP2D6**3

Los productos de PCR se sometieron a restricción con la enzima *Msp I*, con la cual se obtuvieron los genotipos de los pacientes con EH. En esta investigación sólo se identificaron tres genotipos para el alelo *3: el homocigoto normal o tipo silvestre (*1/*1) en 70 individuos, y el heterocigoto (*1/*3) en 70 pacientes con EH analizados (Figura 20).

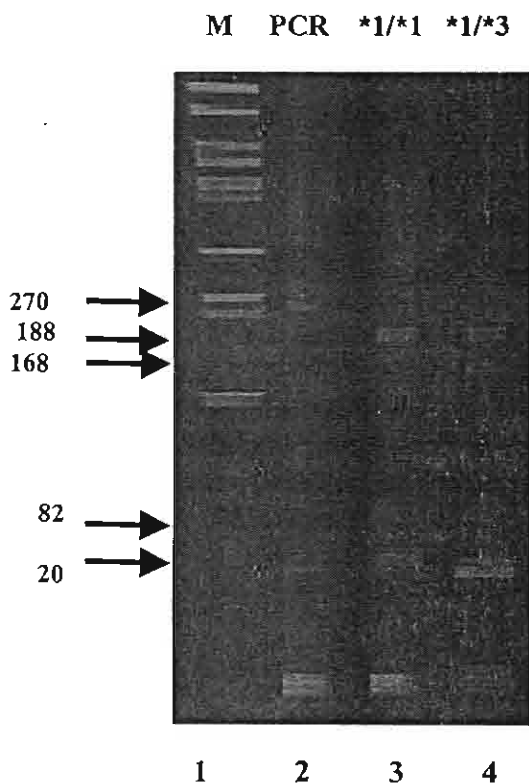


Figura 20. Gel de poliacrilamida al 15%, con los genotipos encontrados para el alelo *CYP2D6**3 en pacientes con EH. Carril 1 Marcador de peso molecular (M), carril 2 producto de PCR sin digerir el cual tiene una banda de 270pb, carril 3 homocigoto normal el cual presenta 188 y 82pb y el carril 4 heterocigoto con cuatro bandas de 188pb, 168pb, 82pb y 20pb.

5.2.1. Tipificación del alelo CYP2D6*4

En este caso los productos de PCR se sometieron a restricción con la enzima *Mva I*, con la cual se obtuvieron los genotipos de los pacientes con EH. Se identificaron dos genotipos para el alelo *4, el homocigoto normal o tipo silvestre (*1/*1) en 70 pacientes y el heterocigoto (*1/*4) en una muestra de 70 pacientes con EH, en la (Figura 21) tenemos la representación de los genotipos obtenidos en la separación electroforética.

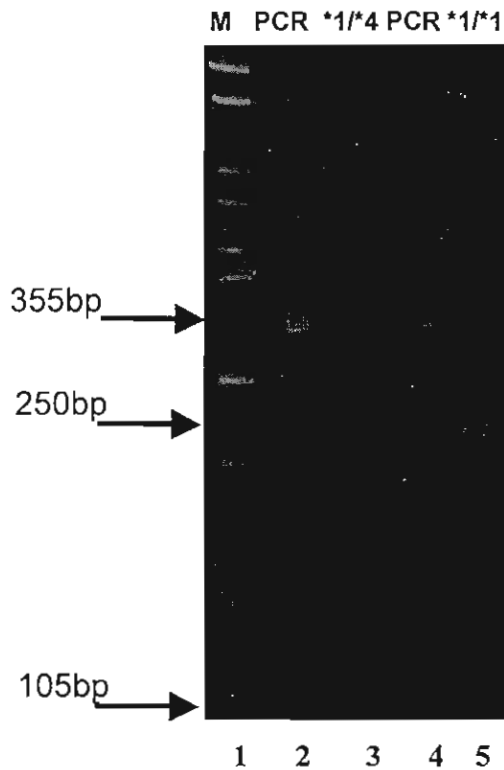


Figura 21. Gel de poliacrilamida al 8%, con los genotipos encontrados para el alelo *CYP2D6*4* en pacientes con EH. Carril 1 marcado de peso molecular (M), carril 2 producto de PCR sin digerir el cual tiene una banda de 355pb, carril 3 heterocigoto 1/*4* el cual presenta 355pb, 250pb y 105pb, carril 4 producto de PCR, carril 5 homocigoto normal *1/*1 con las bandas de 205pb y 105pb.

5.3. Frecuencias Alélicas y Genotípicas de *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4

Los resultados obtenidos para las 70 muestras fueron analizadas para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas.

Frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes mexicanos con enfermedad de Huntington

En la tabla 4 se muestran los resultados del alelo tipo silvestre (*1) con una frecuencia de 88%, el alelo *3 una frecuencia de 1% y el alelo 4 tuvo una frecuencia de 11.7%. En la tabla 5 se observan los genotipos obtenidos para ambos alelos. El homocigoto normal *1/*1 es el que muestra una mayor frecuencia en la población con EH con un 77%, el genotipo heterocigoto *1/*3 tuvo una frecuencia de 0.15%, y el heterocigoto *1/*4 tuvo una frecuencia de 21%. No se observó ningún caso de los genotipos *3/*3 y *4/*4 homocigoto mutado.

Tabla 4. Frecuencias alélicas.

ALELOS <i>CYP2D6</i>	n	FRECUENCIA
*1	124	0.88
*3	1	0.01
*4	15	0.117
TOTAL	140	1.00

Tabla 5. Frecuencias genotípicas.

Genotipos <i>CYP2D6</i>	n	Frecuencia
*1/*1	54	0.77
*1/*3	1	0.015
*1/*4	15	0.21
*3/*3	0	0.00
*4/*4	0	0.00
*3/*4	1	0.014
Total	70	1.00

DISCUSSION HASIL

6. Discusión de resultados

Las concentraciones plasmáticas de los antidepresivos tricíclicos y de los neurolépticos varían extensamente entre pacientes tratados con dosis similares (Llenera y cols, 1992). Esto se debe en gran parte a la marcada variación individual en el metabolismo de los fármacos, que depende de muchos factores (edad, sexo, dieta, ambiente) y de los genes que codifican para enzimas metabolizadoras y para receptores de fármacos (Weinshilboum, 2003).

Los citocromos P450 constituyen las principales enzimas que catalizan la fase I del metabolismo de los fármacos. El citocromo 2D6 (CYP2D6) metaboliza aproximadamente 25% de los fármacos de la práctica clínica actual, entre los que se encuentran antidepresivos tricíclicos y neurolépticos como el haloperidol (Goodman y Gilman, 1996). Estos medicamentos son parte de la farmacoterapia utilizada en los pacientes con enfermedad de Huntington que son atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Los polimorfismos del gen *CYP2D6* han sido considerados como uno de los factores críticos que causan susceptibilidades individuales diferentes en la respuesta a los fármacos. Este gen se localiza en el cromosoma 22q13.1 y es parte de un grupo que incluye dos o tres pseudogenes relacionados (Kimura y cols, 1989). El gen *CYP2D6* es altamente polimórfico y actualmente se han descrito más de 75 alelos (<http://www.imm.ki.ac/CYPalleles>) que se correlacionan con niveles plasmáticos anormales de los fármacos metabolizados por este citocromo P450. Los individuos homocigotos para los alelos funcionales presentan un fenotipo EM (metabolizador rápido), en contraste, los PM (metabolizadores lentos) son homocigotos para alelos no funcionales, mientras que los individuos UM (ultra metabolizadores) presentan duplicaciones del gen funcional (Weinshilboum, 2003). Se ha observado que las frecuencias de metabolizadores lentos de *CYP2D6* varía entre los diferentes grupos étnicos. Por ejemplo, la frecuencia con que se presenta el fenotipo PM en población caucásica es de 5 a 10% (Agúndez y cols, 1994) en la población asiática es de 1% (Dahl y cols, 1995) y para zimbaweanos es de 0 – 8% (Masimirembwa y cols, 1996).

Además, se han observado diferencias en las frecuencias de los alelos mutados que dependen del origen étnico de la población. Por ejemplo, la frecuencia de duplicación de *CYP2D6* varía notablemente, esto es 29% en etíopes (Aklillu y cols, 1996), 20% en árabes sauditas (McLellan y cols, 1997), 1-7% en caucásicos (Agúndez y cols, 1994) y 1-2% en orientales (Dahl y cols, 1995). La frecuencia del alelo *CYP2D6* *3 en población caucásica europea es de 1.89% (Marez y cols, 1997) y está ausente en poblaciones africanas (Masimirembwa y cols, 1996). La frecuencia del alelo *CYP2D6* *4 en población caucásica alemana es de 19.5% (Sachse y cols, 1997) y de 8% en población china (Johansson y cols, 1994).

Varios estudios han investigado la contribución de CYP2D6 en el metabolismo del haloperidol en voluntarios sanos y pacientes. Aunque los datos *in vitro* sugieren que CYP2D6 podría jugar sólo un papel menor en la biotransformación del haloperidol en los seres humanos, todos los estudios exceptuando uno que incluyó sólo un metabolizador pobre de CYP2D6 (Gram, y cols, 1989) ha encontrado un efecto de actividad de CYP2D6 en la farmacocinética del haloperidol. En este individuo metabolizador pobre de CYP2D6 las concentraciones en suero de haloperidol son más altas, mientras que las concentraciones de haloperidol reducido son más altas que las que mostraron los sujetos EM (Llenera, 1992, Young, y cols, 1993). Los niveles de haloperidol reducido y haloperidol en sangre están asociados con un riesgo más alto de reacciones adversas del fármaco. Los niveles del haloperidol reducido se correlacionan con los efectos de extrapiramidalismo y con los efectos colaterales (Lane, y cols, 1997, Altamura, 1998).

En un análisis retrospectivo, el fenotipo metabolizador pobre de *CYP2D6* se encontró que fue significativamente alto en los pacientes con efectos adversos (Spina, 1992). Este hallazgo se corroboró por varios informes que descubrieron una alta incidencia y mayor severidad en los efectos de haloperidol en metabolizadores pobres de CYP2D6 (Iwahashi, 1997, Spina, 1992).

En este estudio se realizó un análisis genotípico de los alelos *CYP2D6* *3 y *CYP2D6* *4 en 70 pacientes con EH. Los resultados mostraron que el alelo tipo silvestre *CYP2D6* *1 tiene una frecuencia de 88%, el alelo *CYP2D6* *3 de 1% y el alelo *CYP2D6* *4 de 11.7%. Los genotipos obtenidos para ambos alelos indican que el fenotipo homocigoto normal o silvestre funcional es el que muestra una mayor frecuencia en la población con EH con un 77%. El genotipo heterocigoto *1/*3 tuvo una frecuencia de 0.15%, y el heterocigoto *1/*4 tuvo una frecuencia de 21%. Los genotipos homocigotos mutados *3/*3 y *4/*4 no se encontraron en ningún caso. Se identificó un paciente heterocigoto compuesto *3/*4 que corresponde a un metabolizador pobre, lo cual se confirmó con el resultado del estudio de fenotipo. Este paciente no está bajo una terapia con fármacos metabolizados por CYP2D6, por lo que no se realizó ningún ajuste de dosis o cambio de medicamentos.

Por otro lado, los resultados mostraron que la frecuencia de metabolizadores lentos de CYP2D6 (1.42 %) en pacientes con EH fue similar a la obtenida en un estudio de una muestra de 130 individuos (1.54%) de población mexicana normal, (comunicación personal, López M). Este resultado era esperado ya que se ha visto que no existe una relación entre los polimorfismos de CYP2D6 y la enfermedad de Huntington.

10 CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONES

Se identificó un paciente con genotipo $*3/*4$ que es un heterocigoto compuesto y su fenotipo también correspondió a un metabolizador pobre. Este paciente no tomaba fármacos metabolizados por CYP2D6 por lo que no realizó una correlación fenotipo-genotipo en cuanto a los efectos adversos. Se debe recomendar que en este paciente no se prescriban fármacos metabolizados por CYP2D6.

La frecuencia de metabolizador lento de CYP2D6 encontrada en los pacientes con EH (1.42%) fue similar a la de los controles de población mexicana (1.54%) como era de esperarse, ya que no existe una relación entre los polimorfismos de CYP2D6 y la enfermedad de Huntington.

Será necesario analizar otro tipo de factores como lo son peso, talla, edad, hábitos de tabaquismo, comedicación para realizar un ajuste farmacoterapéutico adecuado y ajustado a cada paciente, para poder brindar una buena correlación entre estos factores y la eficacia de la terapia con fármacos que sean metabolizados por CYP2D6, en nuestro caso haloperidol.

Es necesario investigar otros alelos de CYP2D6 que puedan producir fenotipos metabolizadores lentos, así como la elaboración de formatos de efectos adversos para que sean aplicados y correlacionados con los resultados de este estudio.

8 Bibliography

8. BIBLIOGRAFÍA

Agúndez JAG, Gallardo L, Ledesma MC, Lozano L, Rodríguez-LA, Pontes JC, Iglesias-M MC, Ponch J, Laredo JM and Benítez J. 2001. Functionally active duplications of the CYP2D6 gene are more prevalent among larynx and lung cancer patients. *Oncology* **61** (1):59-63.

Agúndez J, Ledesma M, Ladero J and Benítez J. 1994. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther* **57**: 265-269.

Akhillu E, persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodríguez F and Ingelman Sundberg M. 1996. Frequency distribution of ultrarapid metabolizer of debrisoquine in an Ethiopian population carry duplicated an multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* **278**: 441-446.

Altamura C, Mauri M, Cavallaro R, Colacurcio F, Gorni A and Bareggi S. 1998. Reduced haloperidol/haloperidol ratio and clinical outcome in schizophrenia: preliminary evidences. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **12**: 689-94.

Braak H and Braak E. 1982. Neuronal types in the striatum of man. *Cell Tissue Res* **227**: 319-42

Bates GP and Davies SW. 1993. Transgenic mouse models of neurodegenerative disease caused by CAG/polyglutamine expansions. *Mol Med Today* **508-15**

Belknap, S.M. and Nelson, J.E. 1993. "Drug interactions in psychiatry". In Musa, M.N. Pharmacokinetics and therapeutic monitoring of psychiatric drugs. Thomas Books. Springfield.

Beresford, R y Ward, A. 1987. Focus on Haloperidol Decaonato. *Drug* **33/1**.

Bertilsson L and Dahl M-L. 1996. Polymorphic drug oxidation: relevance to the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs*; **5**: 200-223

Beutler E. 1991. Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency. *N Eng J Med* **324**: 169-174.

Bene LZ, Kroetz DL and Sheiner LB. 1996. "Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination". In: Goodman & Gilman's. "The pharmacological basis of therapeutics". Mc Graw- Hill. Ninth Edition. 3-27.

Bobadilla AN y Gamba Gerardo. 1996. Reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inv Clin* **48** No. 5: 401-406.

Broly F and Meyer UA. 1993. Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics* **3**(3): 123-130.

- Broly F, Marez D, Lo Guidice JM, Sabbagh N, Legrand M, Boone P and Meyer UA. 1995. A nonsense mutation in the cytochrome P450 CYP2D6 gene identified in a caucasian with an enzyme deficiency. *Hum Genet* **96** (5): 601-603.
- Bruce A, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 1994. "Molecular Biology of The Cell". Third Edition, New York & London.
- Burright EN, Orr HT and Clark HB. 1997. Mouse models of human CAG repeat disorders, *Brain Pathol* **7**:965-77.
- Burgeois, B.F.D. 1995. Important pharmacokinetic properties of antiepileptic drugs. *Epilepsia*. ; **36** (suppl. 5) : S1-S7.
- Campodonico JR and Aylward E. 1998. When does Huntington's disease begin? *JINS* **4**:467-73
- Cedric M. Smith and Alan M. Reynard, 1993. "Farmacología" Argentina.
- Cervantes PA, López LM, Sandoval H y Del Muro R. 2001. ¿Farmacia, Farmacogenética, Farmacogenómica?. *Rev Mex Cien Farm* **32** (4):11-19.
- Cervantes PA y López LM. 1997. Aplicación de las técnicas de la biología molecular en el estudio del genoma humano y en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias. *Rev Med Hosp. Gen Mex* **60** (4): 196-205.
- Ciraulo, D.A., Shader, R.I., Greenblatt, D.J. and Creelman, W.L. 1995. "Drug interactions in psychiatry". W & W. Baltimore,
- Chida M, Yokoi T, Nemoto N, Inaba M, Kinoshita M and Kamataki Y. 1999. A new variant CYP2D6 allele (CYP2D6*21) with a single base insertion in exon 5 in a Japanese population associated with a poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* **9** (3): 287-293.
- Correia MA. 1993. Drug-mediated hememodification of cytochrome P450 apoproteins: structural characterization and physiological implications. *Toxicologist*; **13**: 15.
- Destenaves B and Thomas F. 2000. New advances in pharmacogenomics. *Curr Op Chem Biol* **4**: 440-444.
- De Groot AJ and Vermeulen NPN. 1997. Modeling the active sites of cytochrome P450s and glutathione S-transferases, two of the most important biotransformation enzymes. *Drug Metabolism Reviews* **29** (3): 747-799.
- D'Hebron PV. 1999. Reacciones adversas relacionadas con la metabolización de los fármacos. *Bulleti Groc* **12**(3): 12-15.

-
- Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman- Sundberg M, Sjöqvist F. 1995. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* **274** (1): 516-520.
- Dahl M-L, Yue K-Y, Roh H-Y, Jphansson I, Säwe J, Sjöqvist F and Bertlsson L. 1995. Genetic analysis of the CYP2D6 locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics* **5**: 159-164.
- Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR and Steen VM. 1996. Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* **6** (4): 319-328.
- Daly Ak, Leathart JB, london SJ and Idle JR. 1995. An inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. *Hum Genet* **95** (3): 337-341.
- Davis LG, Dibner MD and Basttey JF. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. 2 th edition. Elsvier Science Publishing.
- Doddi S, Rifkin A, Karajgi B, Cooper T and Borenstein M. 1994. Blood levels of haloperidol and clinical outcome in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* **14**: 187-95.
- Drazen JM, Yandava CN, Dube L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, Israel E, Schork N, Silverman ES, Katz DA and Drajesk. 1999. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *J.Nat Genet.* Jun;22(2):168-70.
- Dure LS, Young AB and Penney JB. 1991. Excitatory amino acid binding sites in the caudate nucleus and frontal cortex of Huntington's disease. *Ann Neurol* **30**: 785-93.
- Elliot S and Vesell MD. 2000. Advances in pharmacogenetics an pharmacogenomics. *J Clin Pharmacol* **40**:930-938.
- Ereshefsky, L., Davis C.M., Harrington, C.A. et al. 1984. Haloperidol and reduced haloperidol plasma levels in selected schizophrenic patients. *J. Clin. Psychopharmacol.*; **4**: 138-142.
- Ereshefsky, L., Jann, M.W. and Saklad, S.R. et al. 1986. Bioavailability of psychotropic drugs : historical perspective and pharmacokinetic overview. *J. Clin. Psychiatry* **47** : 6-15.
- Ereshefsky, L. 1996 Drug-drug interactions involving antidepressants : focus on venlafaxine. *J. Clin. Psychopharmacol.*; **16** (suppl. 2) : 37S-53S.
- Ereshefsky L, Davis CM, Harrington CA, Jann MW, Browning JL, Saklad SR, et al. 1984. Haloperidol and rediced haloperidol plasma levels in selected schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol.* **138**: 42.

Estévez FE, Giusti M, Parrillo A y Prando M. 1997. Variabilidad del metabolismo oxidativo de fármacos en la población uruguaya. Polimorfismo genético del citocromo P-450 2D6. http://www.Smu.org.uy/publicaciones/rmu/1997v2_estevez.htm

Evert B, Griese EU and Eichelbaum M. 1994. Cloning and sequencing of a new non-functional CYP2D6 allele: deletion of T 1795 in exon 3 generates a premature stop codon. *Pharmacogenetics* 4(5): 271-274.

Evert B, Griese EU and Eichelbaum M. 1994. A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350 (4):434-439.

Fang J, Baker GB, Silverstone PH and Countts RT. 1997. Involvement of CYP3A4 and CYP2D6 in the metabolism of haloperidol. *Cell Mol Neurobiol.* 17:227-33.

Forrest, F.M. et al. 1970. Modification of chlorpromazine metabolism by some other drugs frequently administered to psychiatric patients. *Biol. Psychiatry* 2 : 53.

Forsman A and Ohman R. 1977. Studies on serum protein binding of haloperidol. *Curr Ther Res Clin Exp.* 21: 245-55.

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. 1991. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizer of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *J Hum Genet* 48(5): 943-950.

Gaedigk A, Ruseell GR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL and Leeder JS. 1999. Optimization of Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 9: 669- 682.

García O JE, Gallegos A MP, Cantú JM y Figuera LE. 2001. "Farmacogenética y Farmacogenómica" En: Guízar V JJ. "Genética Clínica Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias". Manual Moderno. Ed 3ª. 955-964.

Gerard N, Panserat S and Lucotte G. 2002. Roles of gender, age at onset and environmental risk in the frequency of CYP2D6-deficient alleles in patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 48(2):114-5.

Gerner, R.H. 1993. "Psychiatric effects of nonpsychiatric medications". In Dunner, D.L. Current Psychiatric therapy. W.B. Saunders Company. Philadelphia,.

González T. 2002. "El citocromo es esencial para atender la Farmacogenética" <http://diariomedicovd.recolectos.es/edicion/noticia/0,2458,91470,00.html>

Goodman and Gilman. 1996. "The pharmacological basis of therapeutics". 9th edn. Ed. McGraw-Hill N.Y.

-
- Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M and Wolf CR. 1990. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature* **347** (6295): 773-776.
- Gram LF, Debruyne D, Caillard V, Boulenger JP, Lacotte J, Moulin M, et al. 1989. Substantial rise in sparteine metabolic ratio during haloperidol treatment. *Br J Clin Pharmacol* **27**: 272-5.
- Grebb, J.A. 1995. "General Principles of Psychopharmacology". In Kaplan, H.I. & Sadock, B. "Comprehensive Textbook of Psychiatry". 6th edn. W & W. Baltimore.
- Greenblatt, D.J. and Koch-Weser, J. 1976. Intramuscular injection of drugs. *N. Engl. J. Med* ; **295** ; 542-546.
- Greenblatt, D.J., von Moltke, L.L. and Shader, R.I. 1996. The importance of presystemic extraction in clinical psychopharmacology (editorial). *J. Clin. Psychopharmacol* **16** : 417-419.
- Grise E-U, Asante.Poku S, Ofori-Adjet D, Mikus G and Eichelbaum M. 1999. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* **9**: 715-723.
- Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mihus G, Mörike K. Et al. 1998. Assessment of the predictive power of genotypes for the in vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* **8**:15-26.
- Guengerich, Peter F. 1993. Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*. **81**: (5) 440-447.
- Guze, B.H. and Baxter, L.R. 1986. The serotonin syndrome case responsive to propranolol. *J. Clin. Psychopharmacol.* **6** : 119-120.
- Hanioka N, Kimura S, Meyer UA and Gonzalez FJ. 1990. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3'splice recognition site. *Am J Hum Genet* **47** (6): 994-1001.
- Harhangi BS, Oostra BA, Heutink P, van Duijn CM, Hofman A and Breteler MM. 2001. CYP2D6 polymorphism in Parkinson's disease: the Rotterdam Study. *Mov Disord. Mar* **16**(2):290-3
- Hassanhi MS, Rivera SE, Fuenmayor AM, Marquez GC, Salas D, de Avila LM, Sanabria A and de Ruiz Z. 1995. Relationship between HLA antigens and the HIV infection in patients from the state of Zulia. *Sangre (Barc)*. Apr;**40**(2):109-13.
- Herrera PJ y Gamba Gerardo. 1996^B. La PCR en la práctica clínica. *Rev Inv Clin*. **48** (6) 479-482.

- Hillman RS, Boggs DR, Thompson AR, Finch CA, Winkelstein A and Harker LA. 1998. "Manual de Hematología". Segunda edición, Manual Moderno México.
- Isaza-M CA, Henao BJ y López-G AM. 2000. Mutaciones del gen CYP2D6 en población Colombiana. *Revista Médica de Rizada* 5(1).
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. 1990. "PCR Protocols, a guide of methods and applications". Academic press, INC.
- Iwahashi K, Nakamura K, Suwaki H, Tsuneoka Y and Ichikawa Y. 1997. CYP2D6 HhaI genotype and the neuroleptic malignant syndrome (NMS) [letter]. *Clin Chim Acta*. 265: 143-4.
- Jaen JC, Caprathe BW, Pugsley TA, Wise LD and Akunne H. 1993. Evaluation of the effects of the enantiomers of reduced haloperidol, azoperol, and related 4-amino-1-arylbutanols on dopamine and sigma receptors. *J Med Chem*. 36: 3929-36.
- John A. Belvan et. Al. 1982. "Fundamentos de farmacología, introduccion a los principios de acción de los fármacos" 2ª edición México.
- Johansson I, Oscarson M, Yue Q-Y, Bertilsson L, Sjöqvist F and Ingelman Sundberg M. 1994. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P450 2D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol* 46: 452-459.
- Jobansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F and Ingelman Sundberg M. 1993. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(24): 11825-11829.
- Ji L, Pan S, Marti-Jaun J, Hanseler E, Rentsch K and Hersberger M. 2002. Single-step assays to analyze CYP2D6 gene polymorphisms in Asians: allele frequencies and a novel *14B allele in mainland Chinese. *Clin Chem* 48(7): 983-988.
- Juan L. Mercedes., Augusto Bondani G. and Salvador Navarrete. 1992. Ed. Churchill Livingstone.. "Farmacovigilancia" (una respuesta compartida) España.
- Jürgen Brockmöler, Julia Kirchheimer, Jürgen Schmider, Slike Walter, Christoph Sachse, Bruno Müller-Oerlinghausen and Ivar Roots. 2002. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 72:438-52
- Kalow W and Grant DM. 2001. "Pharmacogenetics". In: The metabolic bases of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 8TH ed. MC Graw Hill, Inc.
- Klaasen, C.D. 1996. Casarett y Doull's toxicology. "The basic science of poisons". 5th ed. MacGraw-Hill. N.Y.

- Kimura S, Umeno M, Skaoda RC, Gelboin HV, Meyer UA and González FJ. 1989. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) locus: séquense and identification of the polymorphic (CYP2D6) gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 45: 889-904.
- Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T and Meyer Ua. 1990. Multiple mutation of the human cytochrome P450id6 gene (CYP2D6) in poor metabolizer of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem* 265 (28): 17209-17214.
- Kenakin, T. 1996. The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol. Rev* 48 : 413-457.
- Kudo S and Ishizaki T. 1999. Pharmacokinetics of haloperidol: an update. *Clin Pharmacokinet.* 14: 159-62.
- Lane HY, Chang WH, Chang YC, Hu OY, Lin HN, Jann MW, et al. 1997. Dose-dependent reduced haloperidol/haloperidol ratios: influence of patient-related variables. *Psychiatry Res.* 72: 127-32.
- Lehninger, Nelson DL and Cox MM (2001). "Principios de bioquímica". Ediciones OMEGA, S.A. Tercera Edición.
- Levy, R.H. 1995. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia* 36 (suppl. 5) : S8-S13.
- Levy, G. 1988. What are narrow therapeutic index drugs? *Clin. Pharmacol. Ther* 63 : 501-505.
- Livingstone and David R. 1993. "Biotechnology and Pollution Monitoring" Use of Molecular Biology. NY.
- Lovlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A and Steen VM. 2001. Polymorphisms in CYP2D6 duplication- negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6* 35 allele in ultrarapid metabolism. *Pharmacogenetics* 11:45-55.
- Lovlie R, Daly Ak, Idle JR and Steen VM. 1997. Characterization of the 16+p Kb and 30+9 Kb CYP2D6 Xba I haplotypes. *Pharmacogenetics* 7(2): 149-152.
- Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR and Daly AK. 1998. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African- Americans and Caucasians in los Angeles. *Pharmacogenetics* 8(6): 529-541.
- Llerena A, C Alm, M-L Dahl, B Ekqvist and L Bertilson.1992. Haloperidol disposition is dependt of debrisoquine hydroxylation phenotype. *Ther Drug Monit* 14:92-97.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lanacaster R and Smith LR. 1977. Polymorphic hidroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*; 2: 584-586

-
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice J-M, Spire C, Lafitte J-J, et al. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 40 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 7: 193-202.
- Marez D, Sabbagh N, Legrand M, Lo-Guidice JM, Boone P and Broly F. 1995. A novel CYP2D6 allele with an abolished splice recognition site associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 5(5): 305-311.
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice JM, Boone P and Broly F. 1996. An additional allelic variant of the CYP2D6 gene causing impaired metabolism of sparteine. *Hum Genet* 97(5): 668-670.
- Marez Allorge D, Ellis SW, Lo Guidice JM, Tucker GT and Broly F. 1999. A rare G2061 Insertion affecting the open reading frame of CYP2D6 and responsible for the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 9(3): 393-396.
- Masimirembwa CM, Johansson I, Hasler UA and Ingelman-Sundberg M. 1993. Genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2D6 in Zimbabwean population. *Pharmacogenetics* 3: 275-280
- Masimirembwa CM, Persson I, Bertilsson L, Hasler J and Ingelman Sundberg M. 1996a. A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6*17) common in a black African population; association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *BR J Clin Pharmacol* 42: 713-719.
- Masimirembwa CM, Hasler J, Bertilsson L, Johansson I, Ekberg O and Ingelman-Sundberg M. 1996b. Phenotype and genotype analysis of debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) in black Zimbabwean population. Reduced enzyme activity and evaluation of metabolic correlation of CYP2D6 probe drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 5: 117-122.
- Melmo, K.L. 1971. Preventable drug reactions. Causes and cures. *N. Engl. J. Med* 284 : 1361-1368.
- Menza, M.A., Murray, G.B., Holmes, V.F. et al. 1987. Decreased extrapyramidal symptoms with intravenous haloperidol. *J. Clin. Psychiatry* 48: 278-280.
- Meyer UA. 1994. Pharmacogenetics: the slow, the rapid and the ultra rapid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1983-1984.
- Miki I, Aoyama N, Sakai T, Shirasaka D, Wambura CM, Maekawa S, Kuroda K, Tamura T, Kita T, Sakaeda T, Okumura K and Kasuga M. 2003. Impact of clarithromycin resistance and CYP2C19 genetic polymorphism on treatment efficacy of *Helicobacter pylori* infection with lansoprazole- or rabeprazole-based triple therapy in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jan;15(1):27-33.
- Mihara K, A Suzuki, T Kondo, N Yasui, H Furukori, U Nagashima, K Otani, S Kaneko and Y Inoue. 1999. Effects of the CYP2D6 *10 allele on the steady.state plasma

- concentrations of haloperidol and reduced haloperidol in Japanese patients with schizophrenia. *Clin Pharmacol Ther* **65**:291-294.
- Münker T. 2000. Farmacogenómica: Fármacos personalizados y medicina personalizada. <http://www.jrc.es/pages/iptsreport/vol138/spanish/FUT3S386.htm>
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase Chain reaction. *Sci Am* **262**: 56-65.
- Maya. 1995. Citocromo P450 2E1 y diabetes. *Colombia Med* **26**: 26-29.
- Melanie JC, Pharma D, Timothy ST and PH D. 1998. Cytochrome P450: New Nomenclature and clinical implications. *Clin Pharmacol*. <http://home.aafp.org/afp/980101ap/cupp.html>
- Mendoza R, Wan YJY, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N and Lin KM. 2001. CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther* **70**: 552-560.
- McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DAP and Ingelman Sundberg M. 1997. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* **11**: 187-191.
- Nebert DW. 1997b. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical significance and why do they exist? *Am J Hum Genet*; **60**: 265-271.
- Nebert DW. 2000. Extreme discordant phenotype methodology: an intuitive approach to clinical pharmacogenetics. *E J Phar* **410**: 107-120.
- Nebert DW and Dieter MZ. 2000. The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* **61**: 124-135.
- Nebert DW. 1999. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: why is this relevant to clinical geneticist?. *Clin Genet* **56**: 274-258.
- Nebert DW. 1997. Pharmacogenetics; 65 candles on the cake. *Pharmacogenetics* **7**:435-440.
- Nebert DW. 1997a. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical significance and why do they exist?. *Am J Hum Genet* **60**: 265-271.
- Nebert DW, McKinnon RA and Puga A. 1996. Human drug metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* **15**:273-278.
- Nebert DW. 1991. Proposed role of Drug-Metabolizing Enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol Endo* **5**(9); 12003-1214.
- Nelson D. 2001. Cytochrome P450s in humans. <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>

-
- Nyberg S, L Farde, C Halldin, M-L Dahl and L Bertilsson. 1995. D2 dopaminic receptor occupancy during low-dose treatment with haloperidol decanoate. *Am J Psychiatry* **152**:173-178.
- Nierenberg, A.A. and Cole, J.O. 1991. Antidepressant adverse drug reactions. *J.Clin. Psychiatry* **52** (suppl.) : 40-47.
- Nuwer, M.R., Browne, T.R., Dodson, W.E. et al. 1990. Generic substitutions for antiepileptic drugs. *Neurology* ; **40** : 1647-1651.
- Ortiz de Montellano PR and Reich NO. 1986. "Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450, structure, mechanism and biochemistry*". Ortiz de Montellano PR (ed.). New York: Plenum Press, Pp. 273-314.
- Oscarson M, Histrand M, Johansson I and Ingelman-Sundberg M. 1997. A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol Pharmacol* **52**(6): 1034-1040.
- Panserat S, Mura C, Gerard N, Vicent- Viry M, Galteau MM, Jacoz -Aigrain E and Krishnamoorthy R. 1995. An unequal cross-over event within the CYP2D6 gene cluster generates a chimeric CYP2D7/CYP2D6 gene which is associated with the poor metabolizer phenotype. *J Clin Pharmacol* **40**(4): 361-367.
- Paulson HL and Fishbeck. 1996. Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. *Ann Rev Neurosci* **19**: 79-107.
- Pan L, De Vriendt C and Belpaire F. 1998. In vitro characterization of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the back oxidation and N-dealkylation of reduced haloperidol. *Pharmacogenetics*. **8**: 383-9.
- Panserat S, Mura C, Gerard N, Vincent-Viry M, Galteau MM, Jacqz- Aigrain E and Krishnamoorthy R. 1994. DNA haplotype-dependent differences in the amino acid sequence of debrisoquine 4-Hydroxylase (CYP2D6): evidence for two major allozymes in extensive metabolisers. *Hum Genet* **94**(4): 401-406.
- Pardridge and W.M. 1988. Recent advances in blood-barrier transport. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* **28** : 25-39.
- Penney JB and Young AB. 1990. Quantitative Autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington's disease. *Neurology*. **32**:1391-15.
- Pentel, P. and Peterson, C.D. 1986. Asystole complicating physostigmine treatment of tricyclic antidepressant overdose. *Ann. Emerg. Med* **9**: 1349-1352.
- Pickar D and Rubinow K. 2001. Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci* **22** (2) : 75-83.

- Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M and Zanger UM. 2000. Elucidation of the genetic basis of the common intermediate metabolizer phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* **10**(7) : 577-581.
- Reidenberg M, M. 1993. Clinical pharmacology. *JAMA* **270**:192-194.
- Richelson, E. 1991: Biological basis of depression and therapeutic relevance. *J. Clin. Psychiatry.* ; **52** (suppl. 6) : 4-10.
- Richelson, E. 1997. Pharmacokinetic drug interactions of new antidepressants: a review of the effects on the metabolism of other drugs. *Mayo Clin. Proc* **72** : 835-847.
- Resine TD, Fiedels JZ, Stern LZ, Johnson PC , Bird ED and Yamamura HI. 1977. Alterations in dopaminergic receptors in Huntington's disease. *Life Sci* **21**:1123-28
- Riesenman C and Pharm D. 1995. Antidepressant drug interaction and the cytochrome P450 system: a critical appraisal. *Pharmacotherapy* **15** (6 Pt 2): 84S-99S
- Rifkin A, Doddi S, Karajgi B, Borestein M and Wachspress M. 1991. Dosage of haloperidol for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*: **48**: 166-70.
- Riker, R.R. et al. 1994. Continous infusion of haloperidol controls agitation in critically ill patients. *Critical Care Medicine* **22**: 433-440.
- Roberts ES, Hopkins NE, Alworth WL and Hellenberg PF. 1993. Mechanismo-based inactivation of an active site peptide. *Chem Res Toxicol* **6**: 470-79.
- Rodríguez- V G J. 2000. El impacto de la genética en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Informática y Salud. <http://www.conganat.org/seis/is/is25/is255.htm>
- Roses A. 2000. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* **405**:857-865.
- Rodríguez-V G J (2001). Farmacogenética: del polimorfismo genético a la medicina personalizada. http://www.clinicamoncloa.es/jornadas2001_a_villanueva.htm
- Robert B and Darnell, MD, PhD. 1993. The polymerase chain reaction: Application to nervous system disease. *Ann Neurol* **34**(4): 513-523.
- Rolfs A, Schuller I, Fincky U and Weber-Rolfs I. 1992. "PCR: Clinical Diagnostics Research". Ed Springer-Verlag Alemania: 1-20.
- Sabbagh N, Brice A, Marez D, Durr A, Legrand M, Lo Guidice JM, Destee A, Agid Y and Broly F. 1999. CYP2D6 polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Mov Disord. Mar* **14**(2):230-6.
- Sachse C, Brockmüller J, Baver S and Roots I. 1997. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population : allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* **60**: 284-295.

- Sachse C, Brockmoller J, Hildebrand M, Muller K and Roots I. 1998. Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 8(2): 181-185.
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Reum T and Roots I. 1996. A rare insertion of t226 in exon 1 of CYP2D6 causes a frameshift and is associated with the poor metabolizer phenotype: CYP2D6*15. *Pharmacogenetics* 6(3): 269-272.
- Sambrook J, Maniatis T and Fritsch EF. 1989. "Molecular cloning, a laboratory manual". 2th EDITION. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Sanders, K.M., Minnema, A.M. and Murray, G.B. 1989. Low incidence of extrapyramidal symptoms in treatment of delirium with intravenous haloperidol and lorazepam in the intensive care unit. *J. Intensive Care Med* 4 : 201-204.
- Sapone A, Vaira D, Trespidi S, Perna F, Gatta L, Tampieri A, Ricci C, Cantelli-Forti G, Miglioli M, Biagi GL and Paolini. 2003. The clinical role of cytochrome p450 genotypes in Helicobacter pylori management. *M.Am J Gastroenterol*. May 98(5):1010-5.
- Schur B., Bjerke J., Nuwayhid N. and Wong S. 2001; Genotyping of cytochrome P450 2D6*3 and *4 mutations using conventional PCR; *Clinical Chemical Acta* 308 (2001) 25 – 31.
- Segall. 1998. 'First Principles Calculation of the Activity of Cytochrome P450. *Phys. Rev. E* 57, p. 4618.
- Sexena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso N and Weiffenbach B. 1994. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet* 3(6): 923-926.
- Shader, R.I., Greenblatt, D.J. and von Moltke, L.L. 1994. Fluoxetine inhibition of phenytoin metabolism. *J. Clin. Psychopharmacol* 14 : 375-376.
- Shargel, L. and Andrew, B.C. 1993. "Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics". Prentice-Hall International. Connecticut.
- Shimida T, Tsumura F, Yamazaki H, Guengerich FP and Inoue K. 2001. Characterization of (+/-)-bufuralol hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 11(2): 143-156.
- Shugart and Lee R. 1996. "Molecular Markers to Toxic Agents" CRC Press Inc. Pág. 133-161.
- Sjogren M, Hesse C, Basun H, Kol G, Thostrup H, Kilander L, Marcusson J, Edman A, Wallin A, Karlsson I, Troell M, Wachtmeister G, Ekdahl A, Olofsson H, Sandstrom A,

- Andreasen N, Minthon L and Blennow K. 2001. Tacrine and rate of progression in Alzheimer's disease--relation to ApoE allele genotype. *J Neural Transm.*;108(4):451-8.
- Someya T, Susuki Y, Shimoda K, Hirokane G, Morita S, Yokono A, et al. 1999. The effects of cytochrome P4502D6 genotypes on haloperidol metabolism: a preliminary study in a psychiatric population. *Psych Clin Neurosci.* 53: 593-7.
- Sterky F and Ludenberg Joakim. 2000. Sequence analysis of genes and genomes. *J. Biotechnol* 76: 1-31.
- Someya T, Shibasaki M, Noguchi T, Takahashi S and Inaba T. 1992. Haloperidol metabolism in psychiatric patients: importance of glucoronidation and carbonyl reduction. *J Clin Psychopharmacol.* 12: 169-72.
- Spina E, Ancione M, Di Rosa AE, Meduri M and Caputi AP. 1992. Polymorphic debrisoquine oxidation and acute neuroleptic-induced adverse effects. *Eur J Clin Pharmacol.* 42: 347-8.
- Steen VM, Molven A, Aarskog and Gulbrandsen AK. 1995. Homologous unequal cross-over involving a 2.8 Kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Hum Mol Genet* 4(12): 2251-2257.
- Strachan T and Andrew P Read. 1998^B. "Human Molecular Genetics". Editorial Wiley-Liss: 304-311.
- Suzuki A, K Otani, K Mihara, N Yasui, S Kaneko, Y Inoue and K Hayashi. 1997. Effects of the CYP2D6 genotype on the steady-state plasma concentrations of haloperidol and reduced haloperidol in Japanese schizophrenic patients. *Pharmacogenetics* 7:415-418.
- Talenti A. 2001. A Farmacogenética, o cómo explicar porqué los fármacos no actúan de la misma manera en todo el mundo.
http://www.boehringer-ingenheim.es/vih/info/ref/cong_chicago_icaac/02.html
- The Huntington's disease collaborative research group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome, *Cell* 72: 971-83.
- Thummel, K.E., O'Shea, D., Paine, M.F. et al. 1996. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther* 59 : 491-502.
- Tyndale R, Aoyama T, Broly F, Matsuanaga T, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, Meyer UA and Gonzalez FJ. 1991. Identification of a new variant CYP2D6 allele the codon encoding Lys-281; possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1(1): 26-32.

Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH and Lai ML. 1993. Molecular basis of genetic variation in debrisoquine hydroxylation in Chinese subjects; polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 53: 410-418.

Wang SL, Lai MD and Huang JD. 1999. G169R mutation diminishes the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese. *Drug Metab Dispos* 27(3): 385- 388.

Wallace RW. 1999. Pharmacogenomics: the next logical step. *Drug Discovery Today* 4: 105-107.

Weber WW. 1997. "Pharmacogenetics". Oxford University Press. New York.

Weinshilboum R. 2003. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*;348: 529-537

Wennergren A, Johansson I, Masele AY, Jande M, Alm C, Aden-Abdi Y, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L and Gustafsson LL. 1999. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 9: 707-714.

Williams D. 1978 "Metabolismo de fármacos". Capítulo 5. Edd acríbia. 94-132. España.

Wieczorek S J and Tsongalis G J. 2001. Pharmacogenomics: will it change the field of medicine?. *Clin Chim Acta* 308: 1-8.

Woodliff HJ and Herrmann RP. 1993. "Hematología clínica". Segunda edición, Manual Moderno. México-Argentina.

Wright SA and Stevens JC:1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol*; 221: 21.

Yokoi T, Kosaka Y, Chida M, Chiba K, Nakamura H, Ishizaki T, Kinoshita M, Gonzalez FJ and Kamataki T. 1996. A new CYP2D6 allele with a nine base insertion in exon 9 in a Japanese population associated with poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 6(5): 395-401.

Young D, Midha KK, Fossler MJ, Hawes EM, Hubbard JW, McKay G, et al. 1993. Effect of quinidine on the interconversion kinetics between haloperidol and reduced haloperidol in humans: implications for the involvement of cytochrome P450IID6. *Eur J Clin Pharmacol*. 44: 433-8.

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?omim+124030 (2000)
124030 Cytochrome P450, Subfamily IID; CYP2D.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=1565> (2000)
CYP2D6 Cytochrome P450, subfamily II

<http://psicofarmacologia.bizland.com/CBfarm.html>

www.dml.georgetown.edu/deptspharmacology/davetab.html

<http://www.biopuc.cl/cursos/bio288/clase2.htm>.

<http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/Documen00/klein/TEMA15.htm>.

Directory of P450-containing systems, 1997. <http://www.icegeb.trieste.it/p450>

[http://www.imm.ki.ac\(CYPalleles\)](http://www.imm.ki.ac(CYPalleles))

Dedication

Agradecimientos

En primer lugar a *Dios* por concederme el don de la vida a cada día de mi existir, por permitirme concluir de manera satisfactoria una etapa más de mi vida profesional y por bendecirme con las amistades que pone alrededor mío. A mi madre que con su ejemplo de persistencia me ha hecho un hombre responsable de mis actos, y de la vida propia, a mi padre por estar siempre ahí, cada vez que fuera necesario, a mi hermano por ser parte importante en planes y aventuras, a mi hermana, que nos enseñó que la barrera entre la vida y la muerte es más ancha, cuanto uno más lo quiera, a mi sobrino que entre travesuras y sonrisas, juega entre la inocencia y el aprender cotidiano, y a toda mi familia que de una u otra forma siempre estuvieron para darme una palabra de aliento y persistencia.

Como olvidar a los grandes amigos y compañeros que sufrieron entre desvelos, noches de PC, repaso y estudio junto a mí todos los obstáculos que la Maestría nos exigía, (Manolo y Daniel). De aquellos que me enseñaron la ciencia de manera fácil y divertida con una sonrisa a cada día, gracias George!! De igual forma a los amigos que han dejado una huella imborrable en mi memoria por todos esos momentos de trabajo, sonrisas y mucha diversión, gracias, Adrián, Memo, Herandy, Sonia, por que junto a ustedes el trabajo nunca fue pesado. Aquellos que con su presencia en el laboratorio lo iluminan con sus detalles de buen humor y amistad, Lety, Chayito, Adriana, Petra y Aurelio.

No podía dejar de mencionar el gran apoyo que me ha brindado la Dra. M. Elisa, la cual me abrió las puertas del laboratorio para convertirlo en mi segundo hogar durante la maestría, gracias por todas las horas que ha dedicado a correcciones y sugerencias de la tesis, gracias por enseñarnos que la vida va más aya con la fuerza de voluntad y siempre de la mano de *Dios*.

Una mención especial merece la Dra. Marisol, por su apoyo y confianza que deposito en mí, al permitirme ser parte de su equipo de trabajo en este proyecto y por todas las horas invertidas en mi tesis, gracias.

*Le doy gracias a Dios por...
colocarte a un lado de mi camino
por que aún sin quererme haz llenado
muchos momentos de mi vida.*

*Por que aún sin poderte amar
me haz llenado de felicidad
y de amargura a la vez.*

*Le doy gracias a Dios por...
haberme dado la dicha de conocerte
de contemplarte... de sentirte
y de poderte amar en silencio.*

*Por que aún sin ser correspondido
me he sentido amado estando a tu lado
por que aunque nunca lo aceptaste
se que tú también al igual que yo me amaste.*

Miguel Angel. Diciembre 2003.