

T
340

83949



UNIVERSIDAD

AUTÓNOMA
UNIDAD XOCHIMILCO

METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

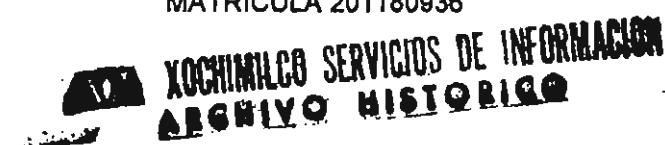
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

FRECUENCIA DEL GENOTIPO METABOLIZADOR LENTO
DEL TIPO *CYP2D6* Y SU POSIBLE EFECTO COMO FACTOR
DE SUSCEPTIBILIDAD EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

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

MATRÍCULA 201180936



COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
ASESOR: DRA. ELISA ALONSO VILATELA
ASESOR: DRA. GILDA FLORES ROSALES

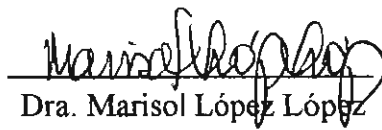
MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2003

COMITÉ TUTORIAL

VoBo

TUTOR


Dra. Marisol López López

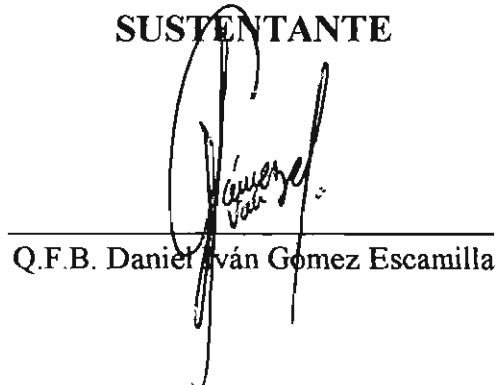
ASESOR

ASESOR


Dra. Elisa Alonso Vilatela


Dra. Gilda Flores Rosales

SUSTENTANTE


Q.F.B. Daniel Iván Gomez Escamilla

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA

Presidente: Dra. TERESA CORONA VÁZQUEZ

Vocal: Dra. HELGI JUNG COOK

Secretaria: Dra. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

**Este trabajo se desarrolló en el Departamento de
Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”**

México, D.F.

Trabajo apoyado por CONACYT

Proyecto no. 37103M

Con todo mi cariño:

A mis PADRES: Guillermo Gómez Guarneros y Rosa Escamilla Magallanes por haberme dado la vida y el ejemplo de lucha por lo que uno anhela, y por su amor, esfuerzo, apoyo, educación, confianza y libertad incondicional que siempre me han brindado.

A mis HERMANOS: Luis G. Gómez Escamilla y Edgar M. Gómez Escamilla por todo lo que hemos compartido y porque aunque somos tan diferentes siempre estaremos juntos.

A mi NOVIA y familia: Adriana López Acosta por todo lo vivido juntos, su apoyo, consejos y palabras de lucha y consuelo brindado incondicionalmente. Se que cuento y que contaré siempre con ustedes, en especial con tigo Adriana.

Agradezco infinitamente a:

A DIOS POR LA OPORTUNIDAD DE VIVIR.

A la UAM-XOCHIMILCO por haberme dado la oportunidad de superarme profesional y personalmente.

A mis profesores de la Maestría por compartir sus conocimientos, orientación, paciencia, apoyo y consejos en mi formación profesional.

Al I.N.N.N. “Manuel Velasco Suárez”, en especial al Dpto. de Neurogenética y Biología Molecular por el apoyo invaluable en la realización del presente trabajo.

Al COMITÉ TUTORIAL: Dra. Elisa Alonso Vilatela, Dra. Gilda Flores Rosales y Dra. Marisol López López por sus conocimientos, guía y apoyo brindados.

Al JURADO: Dra. Helgi Jung Cook y Dra. Teresa Corona Vázquez por la confianza brindada, el tiempo invertido en el dictamen de este trabajo, y por sus críticas y comentarios.

A mis voluntarios sanos y con Parkinson - ejemplos de lucha y vida - por todo su apoyo y confianza, ya que sin ustedes no hubiera sido posible este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio y amigos: Jorge, Lethy, Challito, Adriana, Aurelio, Conchita, Gabino y Quique por compartir sus conocimientos, su orientación, paciencia, apoyo, confianza, risa y esa amistad que hasta ahora compartimos y espero perdure para siempre.

A mis grandes amigos: Sonia Nava, Francisca Palomares, Miguel A. Ramírez, y Manuel Cedillo por su inmensa amistad, apoyo incondicional y simplemente por ser como son.

A todos mis amigos que no necesito nombrar, ellos saben quienes son, los quiero mucho y mil gracias.

CONTENIDO

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. GENERALIDADES	
2.1 <i>Enfermedad de Parkinson</i>	4
2.1.1 Historia de la enfermedad de Parkinson	4
2.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson	5
2.1.3 Tasa de la enfermedad de Parkinson en México	6
2.1.4 Sintomatología de la enfermedad de Parkinson	7
2.1.5 Cuadro clínico de la enfermedad de Parkinson	8
2.1.6 Evolución clínica de la enfermedad de Parkinson	12
2.1.7 Etiología de la enfermedad de Parkinson	13
2.1.8 Genética de la enfermedad de Parkinson	16
2.2 <i>Farmacogenética y ecogenética en la enfermedad de Parkinson</i>	19
2.2.1 Ecogenética en la EP	20
2.2.2 Sistema enzimático del citocromo P450 (CYP)	21
2.2.3 Gen del citocromo P450 2D6 (CYP2D6)	26
2.2.4 Fenotipificación y genotipificación del citocromo P450 2D6 (CYP2D6)	31
2.3 <i>Estudios que han investigado la asociación del CYP2D6 con la etiología de la EP</i>	36
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	38
3.2 Objetivos particulares	38
IV. JUSTIFICACIÓN	
4. Justificación	39
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
5.1 Población estudiada	40

	<i>Pág.</i>
5.2 Criterios de inclusión y exclusión de la población estudiada	40
5.2.1 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de pacientes	40
5.2.2 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo control	40
5.3 Determinación del polimorfismo *3 y *4 del gen <i>CYP2D6</i>	43
5.4 Extracción de DNA genómico	43
5.4.1 Método de extracción de DNA genómico por la técnica de sales-fenol-cloroformo	43
5.4.2 Método de extracción de DNA genómico por columna <i>QIAamp® DNA Blood Midi Kit</i> de <i>QIAGEN®</i>	50
5.5 Análisis espectrofotométrico y electroforético de DNA genómico	54
5.5.1 Análisis espectrofotométrico del DNA genómico	54
5.5.2 Análisis electroforético del DNA genómico	55
5.6 Genotipificación de <i>CYP2D6</i>	56
5.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56
5.6.2 Análisis electroforético del producto de amplificación de la PCR	57
5.6.3 Fragmentos polimórficos de restricción de longitud variable (RFLP) – Restricción enzimática	60
5.6.4 Análisis electroforético de los fragmentos obtenidos de la restricción enzimática	61
5.7 Determinación de la frecuencia alélica	61
VI. RESULTADOS	
6.1 Tamaño de muestra	63
6.2 Extracción del DNA genómico	66
6.3 Análisis espectrofotométrico y electroforético del DNA genómico	67
6.4 PCR (<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>)	68
6.5 RFLP (<i>Restricción enzimática</i>)	68
6.6 Frecuencias alélicas	70
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	74

	<i>Pág.</i>
VIII. CONCLUSIONES	79
IX. ANEXOS	
9.1 Preparación de reactivos	81
9.2 Preparación de geles y colorantes para geles no desnaturalizantes	83
9.3 Preparación de colorantes para geles no desnaturalizantes	85
9.4 Secuencia normal del gen <i>CYP2D6</i>	85
X. BIBLIOGRAFÍA	91

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1. Síntomas de la enfermedad de Parkinson	8
Tabla 2. Escala de <i>HOEHN & YAHR</i> para clasificación del estadio de la EP	12
Tabla 3. Estudios caso-control de polimorfismos genéticos en la EP	18
Tabla 4. Principales enzimas metabolizadoras en fase I y II en el hígado humano	22
Tabla 5. Clasificación general de las familias de los citocromos P450	24
Tabla 6. Principales polimorfismos farmacocinéticos en las enzimas metabolizadoras de fármacos y su frecuencia en diferentes grupos étnicos.....	27
Tabla 7. Substratos de <i>CYP2D6</i>	28
Tabla 8. Frecuencias de metabolizadores pobres y ultrametabolizadores en diferentes poblaciones (sanas) genotipadas	30
Tabla 9. Fármacos testigo para establecer fenotipos CYP	32
Tabla 10. Inhibidores de la <i>CYP2D6</i>	33
Tabla 11. Estudios que han investigado la asociación del gen <i>CYP2D6</i> con la etiología de la EP en diferentes poblaciones	37
Tabla 12. Secuencia de los oligonucleótidos y enzimas de restricción empleadas para la determinación genotípica de los alelos de <i>CYP2D6</i>	56
Tabla 13. Mezcla por reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés en la determinación genotípica de los alelos *3 y *4 del <i>CYP2D6</i>	57
Tabla 14. Condiciones de amplificación para los pares de oligonucleótidos	57
Tabla 15. Mezcla por RFLP para la obtención de los fragmentos de interés en la determinación genotípica de los alelos *3 y *4 del <i>CYP2D6</i>	60
Tabla 16. Lista de DNA genómico de los 61 pacientes con EP pertenecientes a la población mestiza mexicana que conforman el banco de DNA de casos creado en este estudio	63
Tabla 17. Lista de DNA genómico de los 131 controles pertenecientes a la población mestiza mexicana mayor de 49 años y sin rasgos de padecer alguna enfermedad neurodegenerativa que conforman el banco de DNA creado en este estudio	64
Tabla 18. Frecuencias genotípicas de la población mexicana con EP y de voluntarios sin enfermedades neurodegenerativas	72
Tabla 19. Frecuencias alélicas de la población mexicana con EP y de voluntarios sin enfermedades neurodegenerativas	72
Tabla 20. Análisis estadístico del <i>CYP2D6</i> en pacientes y controles	73
Tabla 21. Características de la población mestiza mexicana analizadas en este trabajo	75
Tabla 22. Comparación de la razón de momios encontrada en población mexicana con la reportada en otras poblaciones	76
Tabla 23. Comparación de la frecuencia alélica encontrada en población mexicana con la reportada en otras poblaciones en las que no encontraron asociación con la EP	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Las fotografías muestran la postura típica de un paciente con EP	4
Figura 2. Localización de la sustancia negra y representación esquemática de las inervaciones dopaminérgicas	6
Figura 3. Síntomas comunes de la EP	13
Figura 4. La región de la <i>parts compacta</i> y la <i>sustancia negra</i> en un cerebro normal	14
Figura 5. Los cuatro citocromos P450 más importantes para la oxidación de fármacos	25
Figura 6. Localización del gen <i>CYP2D6</i> , locus 22q13.1	26
Figura 7. Proporción de fármacos metabolizados por las principales enzimas del citocromo P450	29
Figura 8. Representación esquemática de un gel de poliacrilamida	62
Figura 9. Foto representativa de 192 muestras de DNA genómico analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%	67
Figura 10. Foto representativa de 192 muestras amplificadas por PCR para el alelo <i>CYP2D6</i> *3 y *4 analizadas en geles de agarosa al 3%	68
Figura 11. Gel de poliacrilamida al 15% para identificar los genotipos del alelo <i>CYP2D6</i> *3	69
Figura 12. Gel de poliacrilamida al 8% para identificar los genotipos del alelo <i>CYP2D6</i> *4	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Carta de consentimiento informado	<i>Pág.</i> 41
Cuadro 2.	Esquematización del producto amplificado por PCR para el alelo <i>CYP2D6*3</i>	58
Cuadro 3.	Esquematización del producto amplificado por PCR para el alelo <i>CYP2D6*4</i>	59

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<i>Pág.</i>
Esquema 1. Diagrama de flujo que representa el orden en que se realizaron las técnicas empleadas en esta investigación	44
Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de <i>sales-fenol-cloroformo</i>	45
Esquema 3. Protocolo de extracción de DNA genómico por columna <i>QIAamp® DNA Blood Midi Kit</i> de <i>QIAGEN®</i>	51

I. Resumen

1. Resumen

Hasta la fecha, la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP) idiopática no ha sido totalmente aclarada, sin embargo, se considera que es una enfermedad multifactorial en donde se ven involucrados tanto factores ambientales como genéticos. Debido a la demanda neuronal dopaminérgica que desencadenan ciertas neurotoxinas, algunos estudios sugieren que el riesgo de desarrollar la EP se ve incrementado en personas que viven en áreas rurales, expuestas a aguas contaminadas, herbicidas, pesticidas, u algún otro agente industrial neurotóxico; lo cual apunta a que esta enfermedad pudiera ser causada por neurotoxinas ambientales a las cuales ciertos individuos son genéticamente más susceptibles. Parte de esta susceptibilidad genética puede ser conferida por polimorfismos genéticos de los citocromos P450. Uno de los principales miembros de esta superfamilia es la 4-Hidroxilasa de desbrisoquina (CYP2D6), que es codificada por el gen del citocromo *P450 2D6 (CYP2D6)*, el cual es muy polimórfico. Esta enzima es responsable de metabolizar aproximadamente el 25% de los fármacos utilizados en la práctica clínica actual, y de algunas neurotoxinas y compuestos endógenos.

Barbeau y cols. (1985) fueron los primeros en sugerir que los individuos homocigotos para alelos mutantes de CYP2D6 (metabolizadores lentos) son más susceptibles a presentar enfermedad de Parkinson. Algunos análisis genéticos revelaron la asociación de la mutación *CYP2D6*B* con la EP. Esta mutación, también conocida como *CYP2D6*4* (polimorfismo *B*), involucra una sustitución de la base G₁₉₃₄ por una A y es la más común en la población caucásica, con una frecuencia alélica del 21.5 al 28.6%. El individuo homocigoto mutante **4/*4* muestra un genotipo PM (metabolizador pobre), mientras que los sujetos normales **1/*1* muestran un fenotipo EM (metabolizador extenso). Una segunda mutación común es la *CYP2D6*3*, que tiene una frecuencia alélica del 2.7% en población caucásica e involucra una delección de la A₂₆₃₇ en el exón 5. Todas las otras mutaciones identificadas son raras y constituyen menos del 1% de todas las variaciones alélicas del *CYP2D6*.

También se ha descrito que los pacientes de población caucásica con un defecto en el gen del citocromo P450 *CYP2D6* con fenotipo metabolizador lento, tienen un incremento de riesgo del 2.54 de presentar la enfermedad de Parkinson en relación a un grupo control, debido a un metabolismo y

una eliminación lenta de fármacos y neurotoxinas. Sin embargo, en otros estudios, no se ha encontrado asociación de las variaciones genéticas del *CYP2D6* con la etiología de la EP por lo que la evidencia es contradictoria.

En México hasta la fecha no se han descrito las frecuencias del genotipo metabolizador del tipo *CYP2D6* tanto en población normal, como en pacientes con EP, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de los genotipos metabolizadores: homocigotos normales ($^{*w}/^{*w}$), homocigotos mutados ($^{*3}/^{*3}$ o $^{*4}/^{*4}$) y heterocigotos ($^{*3}/^{*w}$ o $^{*4}/^{*w}$) del tipo *CYP2D6* en los alelos ^{*3} y ^{*4} en pacientes mestizo mexicanos con EP, y en voluntarios mayores de 49 años, aparentemente sanos, que sirvieron como grupo control para determinar la probable asociación de los alelos mutados de *CYP2D6* con la etiología de la enfermedad de Parkinson. Tanto los individuos sanos como los afectados previamente firmaron carta de consentimiento informado. En todos los casos, el genotipo se determinó mediante análisis molecular de los alelos *CYP2D6* ^{*3} y *CYP2D6* ^{*4} , a partir de DNA genómico extraído de sangre periférica, amplificación de regiones específicas de los alelos ^{*3} y ^{*4} por medio de PCR y su posterior digestión con las enzimas de restricción adecuadas respectivamente. Los fragmentos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y acrilamida teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Se asumió el criterio de que un heterocigoto ($^{*3}/^{*w}$ ó $^{*4}/^{*w}$) y un homocigoto normal ($^{*w}/^{*w}$) tanto para el alelo ^{*3} como para el alelo ^{*4} presentan un fenotipo metabolizador extenso o rápido (EM) que corresponde a una actividad normal de la *CYP2D6*; mientras que un homocigoto mutado ($^{*3}/^{*3}$, $^{*4}/^{*4}$ ó $^{*3}/^{*4}$) presenta un fenotipo metabolizador pobre o lento (PM) que corresponde a un metabolismo lento de fármacos, así como de toxinas endógenas o exógenas, que son metabolizados por la *CYP2D6*.

La frecuencia del alelo *CYP2D6* ^{*4} fue 24.60% en el grupo de pacientes *versus* 22.14% en el grupo control (razón de momios 1.147, IC 95% 0.562-2.342) y del alelo *CYP2D6* ^{*3} fue 1.64% en el grupo de pacientes *versus* 1.53% en el grupo control (razón de momios 1.075, IC 95% 0.096-12.08) indicaron que no existe evidencia estadísticamente significativa para decir que exista una asociación de los genotipos mutados del tipo *CYP2D6* (*CYP2D6* ^{*3} y *CYP2D6* ^{*4}) con la etiología de la enfermedad de Parkinson. Solo se presentó un genotipo homocigoto mutado para el alelo ^{*4} en un paciente con EP y ninguno en el grupo control; así mismo, no se encontró ningún genotipo homocigoto mutado para el alelo ^{*3} , tanto en pacientes con EP como en el grupo control. El análisis

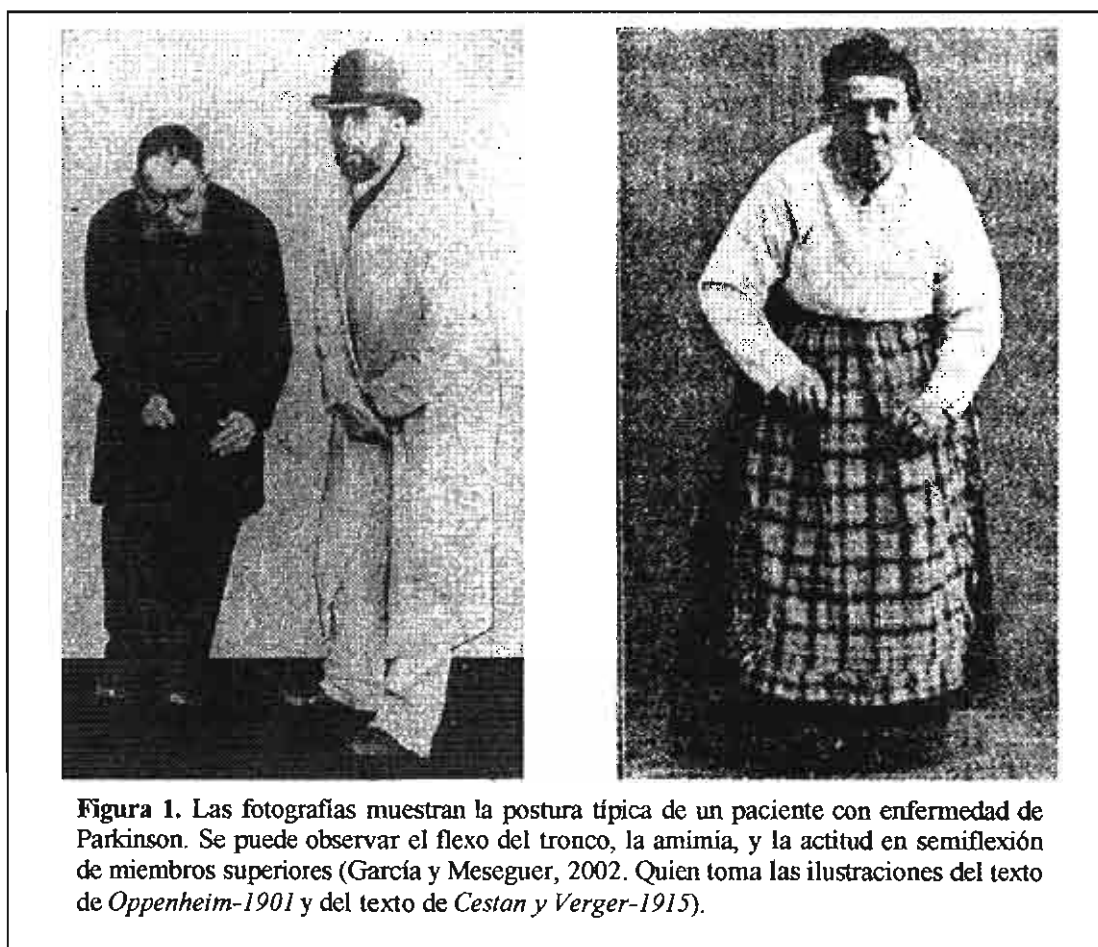
estadístico de estos resultados, sugiere que no existe una asociación entre el genotipo metabolizador lento ($*3/*3$ y $*4/*4$) y el riesgo de presentar enfermedad de Parkinson en la población mestiza mexicana estudiada. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por otros autores.

II. Generalidades

2.1 Enfermedad de Parkinson

2.1.1 Historia de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en el año de 1817 por el médico inglés James Parkinson con el nombre de *parálisis agigante* o *parálisis temblorosa*, exponiendo los síntomas principales de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre. (Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999). A mediados del siglo XX, la EP se conocía bien desde el punto de vista clínico, los autores franceses y alemanes habían dado una descripción prácticamente completa de la sintomatología parkinsoniana (**figura 1**) y los científicos estaban luchando para identificar las causas y tratamientos de la enfermedad (García y Meseguer, 2002).



A principios de la década de 1960, los investigadores identificaron un defecto cerebral fundamental que es el distintivo de la enfermedad: las pérdidas de células cerebrales que producen un producto químico - la *dopamina* - que ayuda a dirigir la actividad muscular. Aunque aún había debates, en general se aceptaba que la sustancia negra era la diana anatómica de la enfermedad; incluso se comenzaba a conocer, a grandes rasgos, el papel fisiopatológico de los ganglios basales en los trastornos del movimiento (García y Meseguer, 2002). Este descubrimiento llevó a los científicos a encontrar el primer tratamiento eficaz de la enfermedad de Parkinson y sugirió formas de elaborar terapias nuevas y aún más eficaces.

2.1.2 Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central (SNC) causado por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro, la cual suministra inervaciones dopaminérgicas al cuerpo estriado que esta constituido por el núcleo caudado y el putamen que contienen receptores dopaminérgicos, reflejándose así en anomalías del control del movimiento. Esta proyección de neuronas simplemente es un componente de la red compleja de interacciones de la estructura interna de la materia gris conocida como ganglios basales (**figura 2**). La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas es un aspecto del envejecimiento normal; sin embargo, la mayoría de las personas no pierden la proporción de 80 a 90% de neuronas dopaminérgicas que se requiere para que se produzca EP sintomática. Debido a esto, se dice que la EP puede deberse a una agravamiento del proceso de envejecimiento normal, en el cual las neuronas que contienen dopamina son especialmente sensibles. Algunos neuroquímicos o condiciones estructurales patológicas afectan los ganglios basales, lo cual conlleva a enfermedades del control motor, clasificadas como desórdenes del movimiento (Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999; Youdim y Riederer, 1997).

La pérdida de células dopaminérgicas se asocia con la presencia de inclusiones eosinofílicas interneuronales, llamadas cuerpos de Lewy, compuestos de neurofilamentos y ubiquitina. La presencia de cuerpos de Lewy no solo se restringe al sistema nervioso central (SNC), ya que subsecuentemente se han observado en el sistema nervioso periférico de pacientes parkinsonianos y

otros desórdenes degenerativos, tales como la enfermedad de cuerpos de Lewy y esclerosis amiotrófica lateral (Blum y col., 2001).

La enfermedad de Parkinson es tanto crónica como progresiva, lo que significa que persiste por un largo periodo de vida y que sus síntomas empeoran con el tiempo. Sin tratamiento, la EP progresa en un plazo de cinco a diez años hasta un estado acinético rígido en el cual los pacientes son incapaces de valerse por si mismos. La muerte suele sobrevenir por complicaciones de la inmovilidad, entre ellas neumonía por aspiración o embolia pulmonar (Goodman & Gilman, 1996).

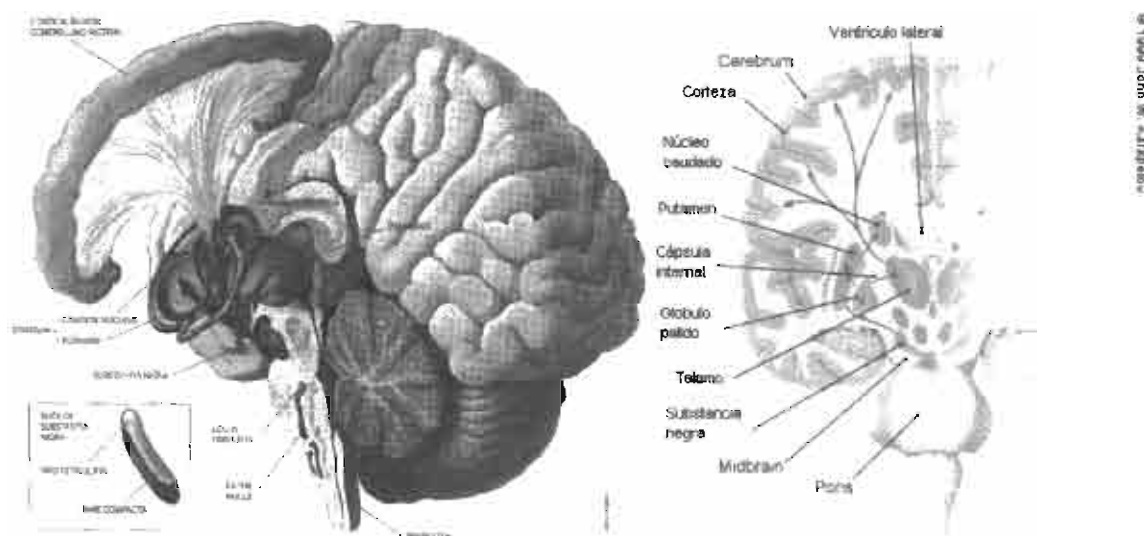


Figura 2. Localización de la sustancia negra y representación esquemática de las inervaciones dopaminérgicas. En la sección de la derecha, se muestra las conexiones en el control motor normal que se relacionan con la enfermedad de Parkinson. Las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra se proyectan al cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). La proyección de neuronas estriales en el glóbulo pálido, y predominantemente neuronas GABAérgicas palidales inhiben la proyección a la corteza cerebral, que a su vez, estimulan proyecciones glutámicas de regreso al estriado y baja a través del tracto corticoespinal (Youdim y Riederer, 1997; Young, 1999).

2.1.3 Tasa de la enfermedad de Parkinson en México

Esta enfermedad se presenta en más del 1% de personas mayores de 65 años de edad. Se considera que la EP ocurre de 1 a 2 casos por 1000 habitantes de la población en general y aumenta con la edad. Un número reducido de casos (5 – 10%) ocurre antes de los 40 años y se llama enfermedad de Parkinson juvenil (www.ssa.gob.mx). Estudios epidemiológicos llevados a cabo en los Estados Unidos sugieren que la enfermedad de Parkinson es más frecuente en hombres que en

mujeres (aproximadamente en proporción 3:2). Alguna vez se pensó que esta enfermedad afectaba principalmente a blancos, pero estudios recientes han demostrado prevalencias iguales en afro americanos y blancos en la misma área geográfica (Young, 1999).

Actualmente en México cada año 50 de cada 100 mil personas mayores de 55 años, sobre todo del sexo masculino, enferman de Parkinson; no obstante, esta tasa es menos frecuente que en el resto del mundo, donde en promedio se registran de 150 a 200 casos anuales por cada 100 mil habitantes (www.ssa.gob.mx).

2.1.4 Sintomatología de la enfermedad de Parkinson

La etiología del parkinsonismo es múltiple pero su sintomatología, cualesquiera que sean sus causas, presenta las mismas marcadas características, entre las que destacan la rigidez muscular, los temblores, la inestabilidad postural, la lentitud y la escasez de movimiento. Estos síntomas pueden aparecer aislados o combinados, pudiendo predominar en una parte del cuerpo o bien ser más marcado un síntoma sobre los demás, de forma que hay gran variación de un enfermo a otro. Los síntomas empiezan en un lado del cuerpo en la mayoría de los pacientes (aproximadamente en el 80%) y menos frecuentemente en ambos lados o generalizados. La variabilidad en la intensidad de los síntomas de la EP, puede cambiar de un momento a otro, o de un día a otro, lo cual es un rasgo característico de esta enfermedad. En razón a estas fluctuaciones, y no a la mala voluntad del enfermo, resulta difícil predecir sus períodos de mayor autonomía (Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999; <http://www.cadime>).

En el comienzo del padecimiento, pueden aparecer molestias muy variables, difíciles de relacionar con la enfermedad. No es raro que los pacientes acudan inicialmente al médico por dolores en las articulaciones (la enfermedad provoca dolores en un tercio de los pacientes y a menudo este hecho se descuida; a veces son dolores pseudo-reumáticos en aquellas partes del cuerpo que están mas afectadas por la rigidez), o al psiquiatra por un estado depresivo (**tabla 1**).

2.1.5 Cuadro clínico de la enfermedad de Parkinson

La EP es de carácter crónico, progresivo y lento, en la cual se encuentra afectada la zona del cerebro encargada del control y coordinación del movimiento, del tono muscular y de la postura. El sistema motor extrapiramidal es el conjunto de vías motoras que ejercen una influencia importante sobre los circuitos motores medulares, del tronco encefálico, cerebelo y corticales. Tiene fibras provenientes de la corteza motora que conectan con los núcleos de la base, especialmente con el caudado y el putamen, así como con núcleos bulbares (núcleo rojo, sustancia negra y formación reticular) o mesencefálicos y terminan en el asta anterior de la médula espinal (Goodman & Gilman, 1996; Youdim y Riederer, 1997; Young, 1999).

Tabla 1. Síntomas de la enfermedad de Parkinson

Síntomas principales	Síntomas secundarios	Trastornos psiquiátricos
Temblor	Trastornos de la marcha	Depresión
Rigidez	Alteraciones de la habilidad manual	Demencia
Bradicinesia	Trastornos del lenguaje	
Trastornos de los reflejos de la postura	Problemas de gesticulación o expresión facial (discinesias) Alteraciones de la presión arterial Sialorrea Costipación fecal Trastornos de la micción	

Tomado de <http://www.ssa.gob.mx/unidades/conadic/abcpark.htm>

En la zona, llamada sustancia negra, se biosintetiza un componente químico, la dopamina, compuesto esencial para la regulación de los movimientos, es decir, para que los movimientos se realicen de una forma efectiva y armónica. Así, en la EP se produce una "degeneración" de la sustancia negra (de causa desconocida) cuya consecuencia es la disminución de la dopamina (Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999). Es por ello que las principales manifestaciones de la enfermedad expresan un control deficiente de los movimientos (**figura 3**), los cuales se caracterizan por cuatro rasgos distintivos:

Temblores pausados no intencionados, a veces el temblor afecta tanto a los miembros superiores como a los inferiores y, ocasionalmente, se presenta también en la boca o en la cabeza. El temblor ocurre con mayor frecuencia cuando los pacientes se hallan en reposo o bajo tensión emocional y siempre en una frecuencia fija de 3 a 6 ciclos por segundo, los cuales suelen disminuirse durante movimientos voluntarios, y suelen desaparecer durante el sueño. Cuando se le indica a un paciente con EP que realice operaciones aritméticas mentalmente también se ve una disminución del temblor. En la mayoría de los casos los temblores se inician en las manos, muy a menudo con movimientos de roce entre el pulgar y los demás dedos, como si el paciente estuviese amasando una miga de pan entre ellos; a medida que la enfermedad avanza, los temblores se extienden a toda la mano. Cuando el paciente está en reposo, los temblores suelen desaparecer, por lo que se llama temblor de reposo. Se acentúan cuando estira la mano para coger algo, si se siente observado o registra alguna emoción. Constituye uno de los síntomas mas habituales, del 70-90% de los pacientes tienen temblor y puede llegar a ser incapacitante. Este síntoma puede estar ausente en un grupo de pacientes, en el llamado Parkinson acinético. Sin embargo, no todas las personas que presentan temblor, tienen o tendrán enfermedad de Parkinson; existen múltiples causas de temblor, que responden a tratamientos diferentes a los usados en la enfermedad de Parkinson.

Rigidez muscular, de la mayor parte, sino de toda la musculatura del cuerpo. Los pacientes que tienen este síntoma presentan dificultad para levantarse de una silla o darse la vuelta en la cama; otra manifestación frecuente puede ser dolor y rigidez a nivel de un hombro, motivo por el cual el paciente puede ser tratado inicialmente de reumatismo, pero con el tiempo aparecen otros síntomas de la enfermedad. Se muestra como una resistencia o falta de flexibilidad para mover pasivamente las extremidades. Su frecuencia varía de un 89 a un 99% según los estudios. Se presenta, al estirar la extremidad afectada, el signo de la “rueda dentada o engrane”. La rigidez y lentitud de los músculos en la cara (hipomimia), del lenguaje y de la deglución, así como la disminución del parpadeo ocasionan una rigidez en el semblante del paciente que da la impresión de tener una “cara congelada”. Todo esto puede dar la impresión de una persona ausente, indiferente, intelectualmente deteriorada o deprimida; en la mayoría de los casos nada de esto es verdad. Sus facultades intelectuales están intactas, aunque son más lentas de lo habitual.

Bradicinesia o acinesia, se presenta en el 77-87% de los pacientes. Se manifiesta en una lentitud y torpeza general en la realización de los movimientos voluntarios. Afecta de forma importante las actividades de la vida diaria, como: alimentarse, bañarse, vestirse y arreglarse, control al orinar y defecar, caminar, escribir, subir y bajar escaleras, usar el teléfono, ir de compras, preparar la comida, lavar la ropa, montar en bus, taxi o metro, responsabilizarse de sus medicamentos, manejar los asuntos económicos propios y de la casa, etc.

Trastornos del equilibrio en la postura (inestabilidad). Las anomalías de la postura se reflejan: en la inclinación del tronco y cabeza hacia adelante con la espalda encorvada; en la flexión de las articulaciones de los codos y rodillas (**figuras 1 y 3**); y en los trastornos de la marcha. Tiende a presentarse de forma tardía. Resulta difícil el control del equilibrio, por lo que pueden producirse caídas con frecuencia. La marcha es a pequeños pasos, con episodios de estar bloqueado, pegado al suelo o congelado, y con aumento brusco del ritmo de la marcha (mini-pasos muy rápidos y confusos).

Temblo rítmico. A menudo ocurre al principio en una mano, este temblor se parece al movimiento que se hace al hacer rodar una pildora entre el dedo pulgar y el dedo índice.



Balanceso hacia delante y atrás. Lo que se refleja en deterioros del equilibrio y coordinación.



Dificultad al ponerse de pie. Se levantan en una postura que asemeja a una gallina ponedora. lo cual es un signo común de trastorno en el control del movimiento.

Algunos pacientes reportan sentimientos de debilidad y de ser retrechados por sogas u otras fuerzas externas.



Rigidez muscular. Se observa un fenómeno de rueda dentada o de engrane al momento de empujar el brazo se observan incrementos accidentados en lugar de movimiento suave y continuo.

Encogimiento de letra. Solo se observa en algunos pacientes. En las muestras de escritura se observa la letra cuando un paciente está tranquilo y cuando no lo está.



Figura 3. Síntomas comunes de la EP incluyendo temblor, rigidez muscular y bradicinesia –movimientos lentos y retardados del movimiento espontáneo. También se pueden observar desórdenes del balance y cambios en la forma de escribir (Youdim y Riederer, 1997).

2.1.6 Evolución clínica de la enfermedad de Parkinson

La EP tiene un curso crónico y progresivo, y la evolución es diferente en cada paciente. Se han podido establecer diferentes etapas clínicas, ya que el manejo médico puede ser diferente de acuerdo a la etapa en que se encuentre el paciente.

Para realizar una evaluación y seguimiento adecuados de los pacientes, por parte del médico, existen Escalas de Evaluación Clínica de la Enfermedad de Parkinson; entre las más utilizadas, se encuentran: Escala de WEBSTER; la Escala Unificada de Evaluación de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS); siendo la escala de *HOEHN & YAHR* (tabla 2) la más utilizada.

Tabla 2. Escala de *HOEHN & YAHR* para clasificación del estadio de la EP

Etapa		Descripción
I	Enfermedad unilateral	Signos y síntomas en un solo lado del cuerpo. Síntomas leves. Síntomas molestos pero no incapacitantes. Presencia de síntomas con temblor en alguna extremidad. Cambios en la postura, expresión facial y marcha. Deterioro funcional mínimo o sin él.
II	Afección bilateral o de la línea media del cuerpo	Sin alteración del equilibrio. Síntomas bilaterales. Mínima discapacidad. La marcha y la postura están afectadas.
III	Enfermedad bilateral	Alteración de mínima a moderada. Inestabilidad postural pero aún independiente. Significante enlentecimiento de los movimientos corporales. Dificultad para mantener el equilibrio tanto de pie como al andar. Disfunción generalizada moderadamente severa.
IV	Incapacidad grave	Aún es capaz de caminar cierto recorrido y ponerse de pie sin ayuda. Marcadamente incapacitado. Síntomas severos. Rigidez y bradicinesia. No puede vivir solo. El temblor puede ser menor que en los estadios anteriores.
V	Estadio caquéctico	Invalidez total. No puede andar ni mantenerse de pie. Obligado a permanecer en cama o silla de ruedas. Requiere cuidados de una enfermera.

Tomado de <http://www.cadime.com> ; <http://www.ssa.gob.mx/unidades/conadic/abcpark.htm>

Los pacientes con EP deben saber que su médico los evaluará en forma periódica con este tipo de instrumentos, ya que es necesario conocer su respuesta a los medicamentos, los posibles efectos adversos y el grado de funcionalidad. Con base en dichas evaluaciones, se puede establecer una serie de estrategias terapéuticas.

2.1.7 Etiología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson idiopática o parkinsonismo primario, aún en nuestros días, es la forma más común de la enfermedad. Idiopática es un término que describe un desorden para el cual no se ha encontrado aún una causa. En las otras formas de parkinsonismo se conoce la causa o se sospecha, o el desorden ocurre como efecto secundario de otro desorden neurológico primario. El nombre de *enfermedad de Parkinson* se usa para definir el síndrome descrito, cuando no se detectan para el mismo alguna o algunas causas concretas. El nombre de *síndrome parkinsoniano* se emplea para describir el conjunto de signos y síntomas (esto es lo que significa síndrome) caracterizados por rigidez, temblor y torpeza motriz, cuando éste se debe a otras causas neurológicas (<http://www.ninds.nih.gov>).

Así por ejemplo, se refiere como síndrome Parkinsoniano a una persona que tiene el temblor y la rigidez a causa de una enfermedad neurológica como el Alzheimer, o a alguna otra persona, la cual haya tomado medicamentos que producen estos síntomas como efectos secundarios. Se reserva el nombre de enfermedad de Parkinson para aquellos casos en que, en ausencia de otra enfermedad o causa, aparecen los síntomas referidos sobre movimiento, temblor y rigidez. La importancia de diagnosticar uno u otro proceso recae en el distinto pronóstico. Lógicamente, el síndrome parkinsoniano ligado a otras enfermedades neurológicas tendrá el pronóstico correspondiente a la dolencia causal (<http://www.cadime.com>).

En la actualidad, la etiología de la enfermedad de Parkinson no ha sido completamente aclarada (Guerrero y col., 2002). La enfermedad de Parkinson ocurre cuando ciertas células nerviosas, o neuronas, en un área del cerebro conocida como la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc), mueren o sufren deterioro, aproximadamente el 5% de las células se pierden por año en la EP (Blum y col., 2001). Normalmente, estas neuronas producen un producto químico cerebral importante conocido como dopamina (**figura 4**). La dopamina es un mensajero químico responsable de transmitir las señales entre la *sustancia nigra* (sustancia negra) y el *corpus striatum* (cuerpo estriado), para producir actividad muscular fluida y con propósito. La pérdida de dopamina hace que las células nerviosas del cuerpo estriado actúen sin control, dejando a los paciente incapaces de dirigir o controlar sus movimientos de forma normal. Los estudios han demostrado que los pacientes con EP tienen una pérdida de 80% o más de las células productoras de dopamina en la sustancia

negra, responsables del sistema motor, especialmente de la acinesia (Goodman & Gilman, 1996; Blum y col., 2001; Young, 1999; Youdim y Riederer, 1997). La causa de esta muerte o deterioro celular se desconoce, pero resultados significativos obtenidos de investigaciones hechas por científicos, continúan produciendo pistas nuevas y sumamente interesantes de la enfermedad.



Figura 4. La región de *parts compacta* y la *sustancia negra* (SNpc) en un cerebro normal. A la izquierda se observa oscura, debido a la producción de dopamina en la neuronas, las cuales se observan altamente pigmentadas; cuando las neuronas mueren, por ejemplo en la EP, el color se desvanece (derecha) (Youdim y Riederer, 1997).

Se ha descrito que en la enfermedad de Parkinson idiopática intervienen tanto factores ambientales como genéticos, por lo cual se dice que es una enfermedad multifactorial (Barbeau y col., 1985). Debido a esto, en la actualidad algunos investigadores hacen uso del término “Ecogenética” (Mulvihill, 1985) para referirse a las “diferencias genéticas que determinan la susceptibilidad de los individuos a la acción de agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente” (Nebert, 1997); en este caso, que sean relacionados a la etiología de la enfermedad de Parkinson (ver subtema 2.2.1 **Ecogenética en la EP**).

Algunos estudios sugieren que el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson se ve incrementado en personas que viven en áreas rurales expuestas a pesticidas, aguas contaminadas, o a algún otro agente químico, sugiriendo que esta enfermedad es causada por neurotoxinas ambientales a las cuales algunos individuos son genéticamente susceptibles. Parte de esta susceptibilidad genética puede ser conferida por el polimorfismo del gen citocromo *P450 2D6* (*CYP2D6*), el cual codifica para la enzima 4-Hidroxilasa de desbrisoquina o *CYP2D6*, la cual pertenece a la superfamilia de los citocromos *P450* y está involucrada en el metabolismo oxidativo de algunos fármacos, de la detoxificación de neurotoxinas ambientales, incluyendo la MPTP, así como de compuestos endógenos incluyendo la dopamina (Payami y col., 2001). (McCann y col., 1997; Bandmann y col.,

1997; Tanakay cols., 1998; Barbeau y col., 1985; Leighton y col., 1997; Chan y col., 1998; Mellick y col., 2000; LoH y col., 1998; Nicholl y col., 1999; Iwahashi y col., 1995; Mazzetti y col., 1994; Sandy y col., 1996; Chen y col., 1996; Payami y col., 2001; Armstrong y col., 1992; Tan y col., 2000).

Algunos científicos han sugerido que la enfermedad de Parkinson puede ocurrir cuando una toxina externa o interna destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas. Un factor de riesgo ambiental tal como la exposición a pesticidas, o a una toxina en los alimentos, es un ejemplo de la clase de desencadenante externo que pudiera hipotéticamente ocasionar la enfermedad de Parkinson. La teoría se basa en el hecho de que hay cierto número de toxinas, tales como el 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Alcaraz y col., 2001; Blum y col., 2001; Rojas y col., 2000; Coleman y col., 1996), y medicamentos neurolépticos (Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999), que se saben inducen síntomas de Parkinson en los seres humanos. Sin embargo, hasta la fecha, ninguna investigación ha proporcionado prueba definitiva de que una toxina sea la causa de la enfermedad.

Una teoría relativamente nueva explora el papel de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Después de que los estudios en animales demostraran que MPTP interfiere con el funcionamiento de las mitocondrias dentro de las células nerviosas (Dawson, 2000), los investigadores se interesaron en la posibilidad de que el deterioro en el ADN de las mitocondrias puede ser la causa de la enfermedad de Parkinson (Bandmann y col., 1997; Blum y col., 2001).

Otra teoría más propone que la enfermedad de Parkinson ocurre cuando, por causas desconocidas, el desgaste de las neuronas productoras de dopamina normal, relacionado con la edad, se acelera en ciertas personas. Esta teoría se sustenta en el conocimiento de que la pérdida de mecanismos protectores antioxidativos está asociada con la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento (Blum y col., 2001).

Algunas otras teorías, sostienen que radicales libres (moléculas inestables y potencialmente perjudiciales generadas por acciones químicas normales en el cuerpo) pueden contribuir a la muerte de las células nerviosas conduciendo así a la enfermedad de Parkinson (Blum y col., 2001). Los radicales libres son inestables debido a que carecen de un electrón. En un intento por reemplazar el

electrón que falta, los radicales libres reaccionan con las moléculas circundantes (especialmente con metales tales como el hierro, cobre, etc), en un proceso llamado oxidación. Se considera que la oxidación ocasiona daño a los tejidos, incluyendo las neuronas. Normalmente, los antioxidantes, productos químicos que protegen a las células de este daño, mantienen bajo control el daño producido por los radicales libres. Las pruebas de que los mecanismos oxidativos pueden ocasionar o contribuir a la enfermedad de Parkinson incluyen el hallazgo de que los pacientes con la enfermedad tienen niveles elevados de hierro o cobre en el cerebro, en especial en la sustancia negra, y niveles decrecientes de ferritina, que sirve como mecanismo protector rodeando o formando un círculo alrededor del hierro y aislándolo (Alcaraz y col., 2001; Blum y col., 2001; Rojas y col., 2000; Coleman y col., 1996).

Es importante reconocer que diversos trastornos distintos a la EP, pueden generar también parkinsonismo, entre ellos algunos problemas neurodegenerativos relativamente infrecuentes, los accidentes apopléticos y la intoxicación con fármacos que bloquean al receptor de dopamina. Algunos fármacos de uso frecuente en la clínica que pueden producir parkinsonismo son: antipsicóticos como haloperidol y torazina, y antieméticos como proclorperazina y metoclopramida (Goodman & Gilman, 1996).

Muchos investigadores creen que una combinación de estos cuatro mecanismos (daño oxidativo, toxinas ambientales, predisposición genética y envejecimiento acelerado) finalmente contribuyen a la etiología de la enfermedad de Parkinson (Blum y col., 2001).

2.1.8 Genética de la enfermedad de Parkinson

Cuando se habla de lesiones que son causa de la EP, se refiere sobre todo a aquellas alteraciones que tienen relevancia clínica y no solo significancia estadística, es decir, a aquellas que se asocian con frecuencia a la enfermedad (García, 2001).

La posibilidad de una contribución genética en la EP, la describió por primera vez Gowers, quien encontró que un 15% de sus pacientes tenían historia familiar de la enfermedad. Más tarde Mjones describió historial familiar positivo en un 41% de sus pacientes y sugirió que la enfermedad era heredada en un alto porcentaje como autosómica dominante (Foltynie y col., 2002).

Las mutaciones en el gen de la α -sinucleína, localizado en el cromosoma 4q, han demostrado ser casos raros de una forma autosómica dominante en adultos; por otra parte, mutaciones en el gen de la parkina, localizado en el cromosoma 6q, han sido reportadas en familias con formas autosómicas recesivas juveniles. Debido a que muchos pacientes no tienen una historia clara de algún familiar afectado o factor de riesgo ambiental, la enfermedad puede deberse a una combinación de “influencias” o “causas” genéticas y ambientales (Scott y col., 2001; Young, 1999; Tan y col., 2000).

En los últimos años, se ha tenido gran interés en las interacciones entre factores genéticos y factores ambientales, generando un gran número de estudios que asocian los polimorfismos de diferentes genes con la EP (Tan y col., 2000). Estos genes son estudiados siguiendo 5 características: 1) Su papel relevante en el metabolismo de la dopamina; 2) su importante relación en la activación o detoxificación de xenobióticos y toxinas exógenas en las neuronas dopaminérgicas; 3) su relación en la vía del metabolismo mitocondrial; 4) su papel causante en ciertas formas de EP familiar; y 5) mutaciones puntuales que codifican para ciertas lipoproteínas y receptores de estrógenos, que estén relacionados con la EP (ver **tabla 3**) (Tan y col., 2000).

Los hallazgos genéticos recientes en la enfermedad de Parkinson no permiten explicar la causa de todos los casos de esta afección, pero aportan datos importantes para comprender la patogenia de la enfermedad, como lo son los estudios relacionados con polimorfismos alélicos. Los datos referidos a la asociación de uno u otro alelo poseen una importancia relativa, teniendo en cuenta que el riesgo global de un individuo en concreto depende del riesgo combinado de múltiples genes con el ambiente que lo rodea y en el que se desenvuelve a lo largo de su vida (García, 2001).

Por otro lado, es evidente que las mutaciones descritas hasta la fecha son responsables de una pequeña parte de los casos de EP familiar y de una fracción insignificante de los casos esporádicos (García, 2001); ya que la causa de la EP esporádica no se conoce, y como ya se ha mencionado anteriormente, se cree que ésta, es el resultado complejo de una combinación de la predisposición genética de ciertos individuos con la exposición a un ambiente agresivo y desconocido.

Con toda seguridad, faltan descubrir genes que explicaran otros casos de EP atribuibles a herencia mendeliana, pero es seguro que la mayoría de los casos de la EP esporádica no es atribuible

a lesiones genéticas clásicas, sino a herencia multifactorial en donde la función de los factores genéticos es compleja (Barbeau y col., 1985; Cahn y col., 1998; Tan y col., 2000; Scoot y col., 2001; Foltynie y col., 2002; García, 2001).

Tabla 3. Estudios caso-control de polimorfismos genéticos en la EP

Tipo de asociación con la EP	Gene
Genes implicados en la detoxificación de metabolitos	Complejo enzimático del Citocromo P450 (<i>CYP2D</i>) N-acetiltransferasa 2 (<i>NAT2</i>) Glutación transferasa (<i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTZ1</i>) Paraoxonasa Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa Manganeso superóxido dismutasa
Genes involucrados en el metabolismo de la dopamina	Monoamino oxidasa A y B (<i>MAOA</i> y <i>MAOB</i>) Transportadores de la dopamina (<i>DAT</i>) Receptores de la dopamina (<i>DRD2</i> , <i>DRD3</i> , <i>DRD4</i> y <i>DRD5</i>) Catecol- <i>O</i> -metiltransferasa (<i>COMT</i>) Tirosina hidroxilasa
Genes mitocondriales	<i>rRNA^{Glu}</i> mitocondrial Subunidades del complejo I
Genes de la EP familiar	α -sinucleína (<i>Park-1</i>) Parkina (<i>Park-2</i>)
Genes de lipoproteínas	<i>APOE-ε4</i> Lipoproteínas de baja densidad relacionadas
Otros genes puntuales	Línea celular Glial derivada del factor neurotrófico Proteína B-50/Gap-43 asociada al crecimiento <i>Tau</i> Locus <i>DXS1047</i> del cromosoma X Enzima convertidora de angiotensina Ubiquitina carboxilo terminal L1

Tomado de Tan y col., 2000.

En años recientes, se han publicado un sin número de trabajos que describen la asociación de determinados alelos de diversos genes, o la ausencia del mismo, con la etiología de la EP. La mayoría de los genes estudiados son aquellos que desempeñan un papel fundamental en el ciclo biológico del sistema dopaminérgico, la excitación neuronal, o en rutas metabólicas, como el metabolismo oxidativo, xenobiótico, o de radicales libres, que en su momento son considerados candidatos putativos por desempeñar un papel (cualquiera que sea) en la etiología de la EP (García, 2001). La realización de estos estudios es fácil, pero la interpretación resulta más complicada. En general, se parte de dos grupos, uno de pacientes con EP y otro control, se mide la frecuencia de los diferentes alelos polimórficos con un marcador determinado en los dos grupos y se analiza si la distribución es similar o diferente desde el punto de vista estadístico (García, 2001).

2.2 Farmacogenética y ecogenética en la enfermedad de Parkinson

2.2.1 Ecogenética en la EP

Como ya se mencionó antes, el resultado de inducir demanda neuronal dopaminérgica y parkinsonismo con MPTP (1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) que se encuentra presente en drogas (heroína) y en agentes químicos; con TIQ (1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolina); con neurolépticos y con manganeso, ha tomado un gran interés en el papel de los factores ambientales por tener una relación importante en la inducción de parkinsonismo (Suzuki y col., 1992; Iwahashi y col., 1995; Coleman y col., 1996; Payami y col., 2001).

El pensamiento actual en la etiología de la EP idiopática sugiere que las formas comunes de este trastorno neurodegenerativo es el resultado de interacciones de susceptibilidad genética con la exposición a toxinas ambientales, por lo que se dice multifactorial. Esto podría sustentarse con la gran heterogeneidad que existe en la respuesta interindividual a ciertos agentes neurotóxicos (Suzuki y col., 1992; Coleman y col., 1996), así como a los medicamentos en términos de toxicidad y eficacia del tratamiento. Las causas potenciales para esta variabilidad en los efectos de ciertos agentes neurotóxicos y de algunos fármacos, incluyen: la patogénesis y severidad de la enfermedad que está siendo tratada; las interacciones entre diferentes fármacos o neurotóxicos, y sus compuestos metabólicos; la edad del individuo; el estado nutricional; la función renal; la función hepática, y/o alguna enfermedad concomitante. La mayoría de las diferencias individuales en la respuesta a los fármacos caracterizadas a escala molecular se relacionan con la densidad en los genes que codifican para las enzimas capaces de metabolizar fármacos y, en menor grado, en los genes que codifican para sus receptores y transportadores; esta variabilidad genética individual en la respuesta a los fármacos constituye el área de estudio de la Farmacogenética (Meyer, 1994; Nebert y col., 1996; McKinnon y Evans, 2000; Cervantes y col., 2001).

En 1957, Motulsky fue el primero en sugerir que ciertas reacciones adversas a los medicamentos podrían ser causadas por variaciones, determinadas genéticamente, en la actividad de las enzimas responsables de su metabolismo a nivel hepático. Poco después Vogel en 1959 acuñó el

término Farmacogenética para describir la reacción entre la constitución genética de un individuo y la terapia farmacológica. Por lo tanto, la Farmacogenética estudia la variación genética responsable de las diferencias individuales en la respuesta a los fármacos y a los xenobióticos. Estas variaciones pueden implicar diferencias individuales en la eficiencia terapéutica y/o reacciones adversas al fármaco. Posteriormente el término “Farmacogenética”, fue ampliado al de “Ecogenética” para abarcar las diferencias genéticas que determinan la susceptibilidad de los individuos a la acción de agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente (Nebert, 1997).

La EP puede ser un ejemplo de estudio para la ecogenética (McCann y col., 1997; Bandmann y col., 1997; Tanaka y col., 1998; Barbeau y col., 1985; Leighton y col., 1997; Chan y col., 1998; Mellick y col., 2000; LoH y col., 1998; Nicholl y col., 1999; Iwahashi y col., 1995; Mazzetti y col., 1994; Sandy y col., 1996; Chen y col., 1996; Payami y col., 2001; Armstrong y col., 1992; Tan y col., 2000). Ya que como se ha mencionado anteriormente, parte de esta susceptibilidad genética puede ser conferida por el polimorfismo oxidativo de desbrisoquina conferido por el gen *CYP2D6*, el cual se conoce por estar involucrado en el metabolismo y la respuesta de fármacos utilizados clínicamente, de neurotoxinas ambientales, así como de algunos otros compuestos exógenos y endógenos. Más de 30 isoenzimas de CYP han sido caracterizadas en humanos (Linder y col., 1997; Benny y Adithan, 2001). Los pacientes de población caucásica con un defecto en el gen del citocromo P450 *CYP2D6* (fenotipo metabolizador lento), tienen un incremento de riesgo del 2.54 de presentar la enfermedad de Parkinson en relación a un grupo control (Chan y col., 1998).

El polimorfismo genético se ha asociado a tres clases de fenotipos basados en la velocidad del metabolismo de los fármacos y neurotoxinas. Los metabolizadores extensos o rápidos (EM) de un fármaco o neurotoxina, es característico de la población normal y presentan una actividad enzimática normal; los metabolizadores pobres o lentos (PM) son asociados con la acumulación de sus sustratos específicos, de fármacos o neurotoxinas debido a un metabolismo y una eliminación deficiente, y son heredados como un rasgo autosómico recesivo requiriendo la mutación y/o la delección de ambos alelos para la expresión fenotípica; y los metabolizadores ultraextensos (UEM) quienes presentan un incremento en el metabolismo de fármacos y neurotoxinas, y son heredados como un rasgo autosómico dominante debido a la amplificación del gen (Benny y Adithan, 2001; Schur y col., 2001).

Por lo tanto, las personas con un defecto en el gen *CYP2D6* pueden ser más susceptibles a los factores ambientales neurotóxicos y posiblemente pueden ser más propensos a adquirir la enfermedad de Parkinson y otros desórdenes crónicos degenerativos cuando se exponen a dichos factores. De ser cierta esta hipótesis, se podría esperar una frecuencia más alta en el genotipo homocigoto mutado del gen y del fenotipo metabolizador lento de hidroxilación (PM) en los pacientes con Parkinson (Barbeau y col., 1985) en relación con personas sanas.

Barbeau y colaboradores en el año de 1985, fueron los primeros en sugerir que los MP tienen mayor susceptibilidad a desarrollar EP como resultado de la destoxificación lenta de neurotoxinas. Esta hipótesis fue apoyada por estudios farmacocinéticos de la actividad de la *CYP2D6*, pero análisis genotípicos del *CYP2D6* en diferentes poblaciones han sido contradictorios (Chan y col., 1998; Guerrero y col., 2002; Gasser y col., 1996).

2.2.2 Sistema enzimático del citocromo P450 (CYP)

El citocromo P450 se denomina así debido a que en su estado reducido y en presencia de monóxido de carbono presenta un espectro de absorción máximo a 450 nm (Aiache y col., 1983). **CYP** es la abreviación para el citocromo P450 (Benny y Adithan, 2001), un subgrupo de enzimas o isoenzimas relacionadas localizadas en el retículo endoplásmico de hepatocitos y que son expresadas principalmente en el hígado (González, 1992), aunque, también se encuentran presentes en otros órganos, tales como el intestino, pulmones, riñones y cerebro (Riesenman, 1995; Brosen, 1996; Bertilsson y col., 1997).

Las enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos así como de neurotoxinas, xenobióticos y de diversos compuestos endógenos, como esteroides, vitaminas y ácidos grasos, se clasifican en reacciones de fase I (oxidativas) y reacciones de fase II (conjugativas); estas reacciones pueden ser complementarias entre sí. Por ejemplo, las reacciones de fase I como oxidación, reducción e hidrólisis, generan grupos funcionales que podrían servir subsecuentemente como sitios de conjugación para ácido glucurónico, sulfato, o glutatión, catalizados por enzimas hepáticas de fase II (Poulsen y Loft, 1994). En la **tabla 4**, se presentan las principales enzimas que forman parte de las reacciones de fase I y fase II encontradas en el hígado humano.

Tabla 4. Principales enzimas metabolizadoras en fase I y II en el hígado humano

Fase I	Fase II
CYP1A2 CYP2A6 CYP2B CYP2C19* CYP2D6* CYP2E1* CYP3A* NADPH-quinona Oxidoreductasa*	Glutación S-transferasa * N-acetiltransferasa * UDP-glucoronosilotransferasa * Sulfotransferasa
* Enzimas que se conoce que exhiben polimorfismo genético en el humano	

Tomado de Poulsen y Loft, 1994.

El sistema enzimático del citocromo P450 (o más apropiadamente, hemotiolato P450) es el grupo más importante en las reacciones de fase I y representa una superfamilia de enzimas que catalizan el metabolismo de muchos compuestos endógenos y exógenos (Steven y Kearns, 1997). En mamíferos, la mayoría de los xenobióticos son metabolizados vía metabolismo hepático fase I por medio de monooxigenasas CYP. Más de 30 formas diferentes de estas proteínas de hemotiolato han sido caracterizadas en humanos (Linder y col., 1997; Benny y Adithan, 2001).

En 1987, con el fin de unificar criterios relacionados a la superfamilia P450, un grupo de investigadores estableció una nomenclatura, la cual agrupa a los citocromos P450 dentro de “familias” y “subfamilias”, definidas solamente en base a la similitud de su secuencia de aminoácidos. En pocas excepciones, una secuencia proteínica P450 de una familia presenta arriba del 40% de similitud con otra familia de P450. Las secuencias proteicas P450 en una subfamilia siempre comparten más del 55% de su similitud (Shen, 1997; Benny y Adithan, 2001; Galli y Feijoo, 2002). En este sistema de nomenclatura, como ya se mencionó antes, el prefijo CYP es utilizado para designar al sistema del citocromo P450 (Riesenman, 1995; Benny y Adithan, 2001) y se designa con un número arábigo, comenzando con el 1 para las familias del gen. Por ejemplo, las enzimas hepáticas primarias metabolizadoras de fármacos, están comúnmente agrupadas en cuatro familias designadas del 1 al 4 (**ver tabla 5**). Los P450 extrahepáticos involucrados en la síntesis de esteroides pertenecen a las familias 18, 19 y 21 (**ver tabla 5**). Las subfamilias se representan con letras mayúsculas secuenciales y los genes individuales dentro de la subfamilia son denotados por números arábigos secuenciales después de la letra (González, 1989; Benny y Adithan, 2001; Galli y Feijoo,

2002). Por ejemplo, *CYP2D6* es la isoforma 6 de la subfamilia D incluida en la familia 2 CYP (Benny y Adithan, 2001).

Existen 8 subfamilias en la familia P450 del gen 2, designadas desde la letra A hasta la H; la siguiente subfamilia a descubrir deberá denotarse con la letra I. Los genes individuales se numeran dependiendo de la secuencia de datos publicados (González, 1989).

Cada isoenzima P450 es el resultado de un gen separado. Se han identificado más de 200 genes de citocromo P450 (Nebert y col., 1991; Nelson y col., 1993), pero su contribución al metabolismo de fármacos ha sido difícil de entender debido a la baja especificidad por el sustrato. En el hígado humano se han identificado un mínimo de 12 enzimas P450 distintas que participan en la activación del oxígeno molecular para su incorporación dentro de una amplia formación de sustratos lipofílicos (Murray, 1992).

En el pasado, los alelos del *CYP2D6* habían sido nombrados arbitrariamente utilizando una sola letra después del nombre del gene, pero al incrementarse el número de alelos descubiertos, este sistema se volvió inadecuado. La recomendación actual es que el gen y el alelo sean separados por un asterisco. Los alelos específicos son nombrados por un número arábigo (el cual denota su grupo alélico) y se distinguen por letras latinas capitalizadas (denotándose el subgrupo del alelo). Por ejemplo, la *CYP2D6*4A* y la *CYP2D6*4B* son la misma mutación pero difieren por una substitución silenciosa de una sola base (Benny y Adithan, 2001).

Las copias extras de un alelo (duplicación o amplificación) pueden existir en tándem; por ejemplo, el alelo *CYP2D6L2* contiene dos copias de *CYP2D6L*. Aquí, el arreglo entero de los alelos debe ser referido como *CYP2D6*2X2*. Cuando la duplicación no es del mismo subgrupo, estos son separados por comas (por ejemplo, *CYP2D6*10B, 10C*). Una forma no italicizada de los alelos, omitiendo asteriscos y remplazándolos por un espacio sencillo, es utilizada para nombrar la proteína, por ejemplo, *CYP2D6* 1. Pero ambos alelos italicizados y separados por una diagonal, se utilizan para la designación de genotipos (*CYP2D6*1/CYP2D6*4A*). Las descripciones de los alelos, así como su nomenclatura y referencias relevantes, son continuamente actualizadas en la página Web <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> (Benny y Adithan, 2001).

Existen cuatro enzimas P450 particularmente importantes para la psicofarmacología: CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4. En la **figura 5**, se presenta un esquema de los cuatro citocromos con algunas de sus características más importantes (Brosen, 1996).

Se ha encontrado una variabilidad interindividual en la expresión hepática de enzimas P450 (Forrester y col., 1992; Shimada y col., 1994) y para un individuo, la velocidad de depuración metabólica de un compuesto está en función del fenotipo. De las enzimas involucradas el CYP2C19 y el CYP2D6 se expresan polimórficamente. A la fecha la expresión polimórfica de CYP1A2 no ha sido establecida claramente (Wrighton y Stevens, 1992). En la **tabla 6**, se muestran algunas variaciones determinadas genéticamente que afectan la farmacocinética de algunos fármacos (Cervantes y col., 2001).

Por otra parte, algunos polimorfismos del gen *CYP2D6* han sido asociados a la susceptibilidad de varias enfermedades, como: cierto tipo de cánceres, lupus eritematoso sistémico, adenomas de la pituitaria, neuropatías Balkon, espondilitis anquilosante y síntomas tempranos de la enfermedad de Parkinson (Benny y Adithan, 2001).

Tabla 5. Clasificación general de las familias de los citocromos P450

Clasificación	Función	Familias
Esteroidogénicas	Son las encargadas de sintetizar esteroides para mantener la integridad de la membrana de los organismos unicelulares para que actúen como mediadores hormonales del desarrollo de organismos diferenciados. Poseen sustrato rígido y especificidad de producto. Están situadas en las mitocondrias.	A este grupo le pertenecen las familias 5, 7, 11, 17, 19, 21, 27.
Xenobióticas	Estas metabolizan sustancias biológicas exógenas (de allí el prefijo xeno) permitiendo su eliminación. Se localizan en el retículo endoplasmático liso.	A este grupo le pertenecen las familias 1, 2, 3, 4.

Tomado de Galli y Feijoo, 2002.

Las determinaciones de estos polimorfismos pueden ser de cierto valor clínico en la predicción de los incrementos de riesgo a desarrollar alguna enfermedad que se asocie con la exposición de agentes neurotóxicos ambientales y a la profesión del individuo (Benny y Adithan, 2001).

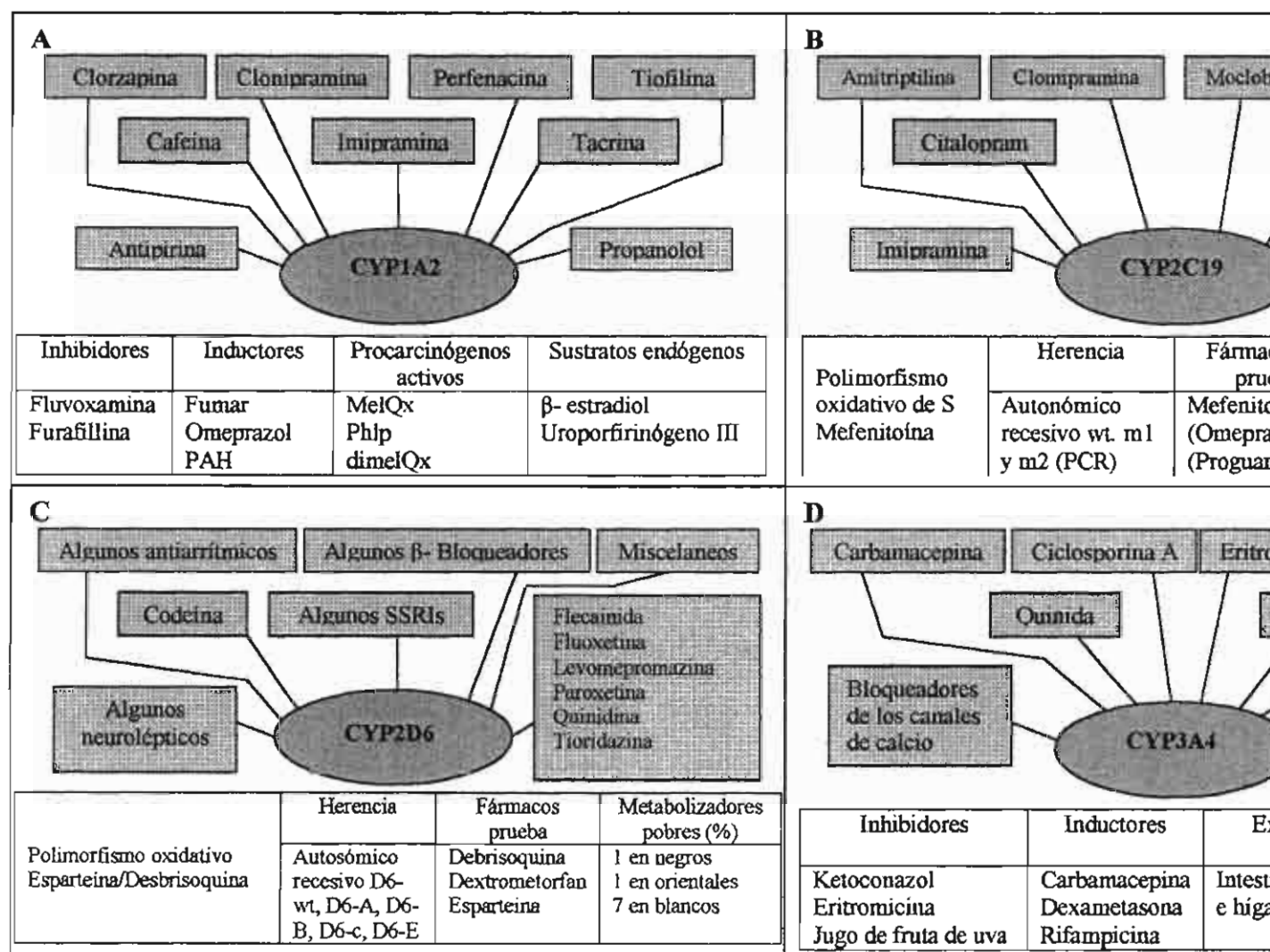
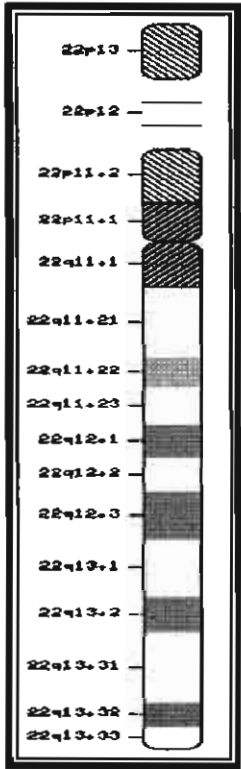


Figura 5. Los cuatro citocromos P450s más importantes para la oxidación de fármacos: citocromo P450 A2 (CYP1A2) (A), CYP2C19 (B), CYP2D6 (C), CYP3A4 (D); (Brosen, 1996).

2.2.3 Gen del citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*)

El gen *CYP2D6* reside en la región *CYP2D6-8* del cromosoma 22 en la región 13.1 del brazo largo (22q13.1) en asociación con los pseudogenes *CYP2D7P* y *CYP2D8P*, en el orden de 5' y 3' en el cromosoma 22 *locus* q13.1-13.2 (ver **figura 6**) (Kimura y col., 1989; Benny y Adithan, 2001).



Este gen codifica para una de las enzimas metabolizadoras de fármacos del citocromo P450, la enzima 4-hidroxilasa de desbrisoquina o *CYP2D6*, (**figura 7**) que está involucrada en el metabolismo oxidativo de más del 25% de los fármacos que actualmente se utilizan en la práctica clínica y de neurotoxinas incluyendo el MPTP, así como de compuestos endógenos incluyendo la dopamina (Payami y col., 2001), ver **tabla 7**.

Este gen es muy polimórfico, y ha sido uno de los defectos genéticos más extensamente estudiados. Se ha considerado que este polimorfismo es uno de los factores críticos que causan susceptibilidad individual a diferentes fármacos y neurotoxinas exógenas en su respuesta metabólica (Benny y Adithan, 2001).

Figura 6. Localización del gen *CYP2D6*, *locus* 22q13.1.
<http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer.fcgi>

El polimorfismo o deficiencia alélica que presenta este gen se debe a la presencia de mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de nucleótidos y duplicación o delección del gen completo (Gaedigk, 1999; Benny y Adithan, 2001).

Sólo el alelo silvestre de este gen, *CYP2D6**1A codifica para la enzima funcional (Kimura y col., 1989; Schur y col., 2001; Benny y Adithan, 2001). Sin embargo se han descrito muchas variaciones genéticas en el sistema *CYP2D6*; siendo dos variantes alélicas no funcionales del gen *CYP2D6* (*CYP2D6**3 y *CYP2D6**4), las que han sido consideradas como los principales factores críticos que causan susceptibilidad individual a ciertos fármacos, neurotoxinas y a algunas

enfermedades, como la EP, esto en base a la actividad metabólica de la CYP2D6 (Benny y Adithan, 2001).

Tabla 6. Principales polimorfismos farmacogenéticos en las enzimas metabolizadoras de fármacos y su frecuencia en diferentes grupos étnicos

Gen	Enzima	Fenotipo	Frecuencia en diferentes grupos étnicos	Ejemplos de fármacos metabolizados	Riesgo de enfermedades
CYP2D6	Citocromo P450 2D6 Hidroxilasa de desbrisoquina	PM	Caucásicos 6%, negros americanos 2%, orientales 1%	Desbrisoquina, codeína, nortriptilina, dextrometorfán	2 – 2.5% riesgo de Parkinson en población caucásica
		EM	Etíopes 20%, españoles 7%, escandinavos 1.5%		Mayor incidencia de cáncer de vejiga, hígado, faringe y estómago. Cáncer de pulmón en fumadores
CYP2C9	Citocromo P450 2C9	PM	No determinada	Tolbutamida, diazepam, ibuprofeno, warfarina	Gran variedad
CYP2C19	Citocromo P450 2C19	PM	Orientales 18–23% caucásicos 4%	Mefenitoína, omeprazol, proguanilo, citalopram	Efectos colaterales por mefenitoína en SNC, rash cutáneo, fiebre, adenopatías generalizadas y discrasias sanguíneas fatales
NAT2	N-acetil transferasa 2	PM	Caucásicos 40–60%, afroamericanos 60%, orientales 10–20%, esquimales 5%, algunas poblaciones mediterráneas 90%	Isoniazida, procaína, sulfonamidas, hidralazinas	Neuropatías periféricas, lupus eritematosos y riesgo de cáncer de vejiga y de mama en fumadores
		EM	Caucásicos 25%, japoneses 70%		Mayor riesgo de cáncer de hígado y colorrectal
TPMT	Tiopurinametil transferasa	PM	Bajo en todas las poblaciones	6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina	No determinadas
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Deficiencia	Mediterráneos 25%, noreuropeos 0%	Ácido nalidixico, nitrofurantoina, sulfas, fenilhidrazina, primaquina	Anemia hemolítica (favismo)
		Actividad aumentada	No determinada		Susceptibilidad a infección por <i>Plasmodium sp</i>

PM = metabolizadores lentos o pobres; EM = metabolizadores rápidos o extensos
Tomado de Cervantes y col., 2001.

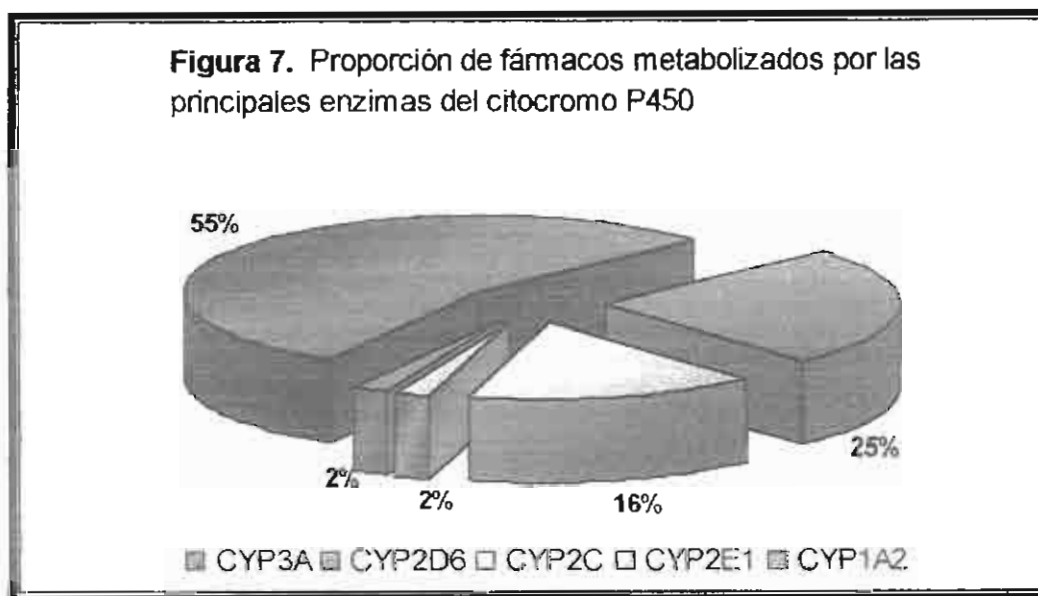
Tabla 7. Substratos metabolizados por la *CYP2D6*

Antihipertensivos y β-bloqueadores			
Alprenolol	Bufuralol	Bunitrolol	Bupranolol
Carteolol	Clonidina	Debrisoquina	Guanoxan
Indoramina	Losartan	Metoprolol	Nimodipina
Nitrendipina	Oxyprenolol	Propranolol	Timolol
Antiarrítmicos			
Amiodarona	Aprindina	Encainida	Flecainida
Mexiletina	Procainamida	N-propilajmalina	Propafenona
Sparteina			
Antidepresivos			
Amiflavina	Amitriptilina	Brofaromina	Citalopram
Clomipramina	Desmetilcitalopram	Desipramina	Fluvoxamina
Fluoxetina	Imipramina	Maprotilina	Minaprina
Moclobemida	Nefazodona	Nortriptylina	Paroxetina
Tomoxetina	Tranilcipromina	Trimipramina	Venlafaxina
Neurolépticos			
Clozapina	Haloperidol	Levomepromazina	Olanzapina
Perfenazina	Pimozida	Risperidona	Sertindola
Tioridazina	Zuclopentixol		
Opiáceos			
Codeína	Dihidrocodeína	Dextrometorfan	Etilmorfin
Hidrocodona	Norcodeína	Oxycodona	Tramadol
Agentes quimioterapéuticos			
Clotrimazol	Doxorubicina	Ketoconazol	Mefloquina
Pirimetamina	Rifampicina	Ritonavir	Roxitromicina
Sulfasalazina			
Antihistamínicos			
Azelastina	Cinnarizina	Loratadina	Prometazina
Miceláneos			
Apigenina	Budesonida	Chloral hydrate	Ciclobenzaprina
Dexfenfluramina	Dibucaina	Dihidroergotamina	Dolansetron
Etiniloestradiol	Fenoterol	Formoterol	4-Hidroxiamfetamina
Laudampsona	MDMA (extasis)	Metoxamina HCl	Metoxiamfetamina
Metoxifenamina	Metoxipsoralen	Metoclopramida	MPTP
Nicergolina	Ondansetron	Perhexilina	Fenformin
Fenilpropanolamina	Quercitina	Serotonina	Tacrina
Tamoxifen	Tolterodina	Tropisetron	

Tomado de Benny y Adithan, 2001.

La mutación mas común es la *CYP2D6**4 (polimorfismo *B*) teniendo una frecuencia alélica del 21.5 al 28.6% en población caucásica e involucra una sustitución de una base de G en el nucleótido 1934 por una A en la unión del intrón 3 / exón 4. La segunda mutación común es la *CYP2D6**3 (polimorfismo *A*) que tiene una frecuencia alélica del 2.7% en población caucásica e involucra una delección de la A en el nucleótido 2637 del exón 5 (Schur y col., 2001). Los individuos con alguno de los dos alelos deficientes, son clasificados como presentadores del genotipo

homocigoto mutado ($^{*3}/^{*3}$ o $^{*4}/^{*4}$) y del fenotipo metabolizador pobre (McCann y col., 1997). Todas las otras mutaciones identificadas son raras y constituyen menos del 1% de todas las variaciones alélicas del *CYP2D6* en población caucásica (Schur y col., 2001).



Goodman & Gilman, 1996; Young, 1999.

Como ya se mencionó antes, este defecto de hidroxilación (mediado por la mutación en el alelo "n") es heredado como un rasgo autosómico recesivo. Los metabolizadores extensos pueden ser homocigotos para el alelo E (EE) u heterocigoto (En). Los metabolizadores pobres son homocigotos por la mutación en el alelo n (nn). Sin embargo, la determinación del heterocigoto es difícil sin el estudio completo familiar (árbol genealógico) (Barbeau y col., 1985).

Mientras que algunos individuos son metabolizadores extensos de desbrisoquina, una baja proporción son metabolizadores pobres y podrían sufrir más efectos secundarios de los fármacos. La proporción de metabolizadores pobres en la población mundial es variable (**tabla 8**); por ejemplo, 1% en egipcios (Mahgounb y col., 1979), del 7 – 10% en caucásicos (Tucker y col., 1977), y del 30% en orientales (Kalow y col., 1980).

Así, determinando el genotipo / fenotipo de hidroxilación de la 4-Hidroxilasa de desbrisoquina *CYP2D6* se puede estudiar la hipótesis generada en el año de 1985 por Barbeau y colaboradores respecto a la etiología de la enfermedad de Parkinson. Sugiriendo, que los

metabolizadores pobres podían tener un incremento de susceptibilidad a la enfermedad del Parkinson debido al daño en la detoxificación lenta de neurotoxinas metabolizadas por la CYP2D6 (Barbeau, 1985). Lo que se traduce, en una metabolización y eliminación lenta de fármacos, toxinas ambientales, y compuestos endógenos llevando a tiempos de latencia y retención más prolongados (Chan, 1998).

Tabla 8. Frecuencias de metabolizadores pobres y ultrametabolizadores en diferentes poblaciones sanas genotipadas

Grupo étnico	Total de sujetos	PM (%)	UEM (%)
Estadounidenses blancos	464	5.8	2.2
Estadounidenses negros	246	3.3	2.4
Alemanes	589	7.0	2.0
Alemanes del sur	195	7.7	1.5
Españoles del norte	147	5.4	5.1
Españoles del sur	217	2.8	3.5
Suecos	270	8.0	1.0
Españoles	258	5.0	1.0
Franceses	265	8.4	1.9
Turcos	404	1.5	5.8
Coreanos	152	0.0	0.3
Chinos	113	0.0	1.3
Nicaragüenses	137	3.6	1.1
Arabia Saudita	101	2.0	21
Etiopianos	122	1.8	29

PM = metabolizadores lentos o pobres;

UEM = ultra metabolizadores o metabolizadores ultraextensos (duplicación del gen)

Tomado de Benny y Adithan, 2001.

2.2.4 Fenotipificación y genotipificación del citocromo P450 2D6 (CYP2D6)

La variabilidad en el gen *CYP2D6*, puede ser evaluada a nivel de fenotipo, investigando la actividad enzimática de la 4-Hidroxilasa de desbrisoquina; o a nivel de genotipo, por medio de la determinación de la presencia de algún alelo mutado (Linder y col., 1997; McKinnon y Evans, 2000; Benny Adithan, 2001). El objetivo en común de estas técnicas, es el de distinguir entre los tres tipos de metabolizadores probables: PM, EM, o UEM (Linder y col., 1997).

● Fenotipificación

La fenotipificación requiere la administración de un fármaco de prueba (testigo), cuyo metabolismo debe ser solamente dependiente de la enzima CYP2D6. Este método involucra la colección de la orina por un periodo de tiempo después de la administración del fármaco testigo, seguido de la determinación de la proporción metabólica (MR por sus siglas en inglés *metabolic ratio*), definida como la proporción de la dosis del fármaco o fármaco inalterado sobre la cantidad metabolizada en suero u orina. Se han utilizado diferentes fármacos testigo para la fenotipificación del *CYP2D6*. Anteriormente, estos estudios se realizaban utilizando desbrisoquina y esparteína; actualmente, se han utilizado con mayor frecuencia el dextrometorfán, el metoprolol y la codeína. En la **tabla 9**, se enlistan las enzimas CYP polimórficas y los fármacos testigo que pueden utilizarse para la medición *in vivo* de su actividad (fenotipificación). Partiendo de que el fenotipo del individuo, es relativo a un sustrato de referencia, la predicción del fenotipo metabolizador para otro sustrato dependerá de la enzima que lo metabolice (Linder y col., 1997; McKinnon y Evans, 2000; Benny y Adithan, 2001).

Este método proporciona indicaciones respecto a la actividad enzimática, pero no identifica si la variabilidad es debida a causas genéticas o a otros factores (McKinnon y Evans, 2000). La proporción metabólica está en función factores tales como: el aclaramiento renal de fármacos, así como de la actividad enzimática. Existen factores de riesgo que pueden modificar estas variables, lo que puede dar lugar a las diferencias en las frecuencias encontradas del MR en diferentes grupos étnicos (Benny y Adithan, 2001).

De los fármacos testigo utilizados para el análisis de la CYP2D6, solo el dextrometorfán se encuentra disponible como medicamento OTC (de libre venta) en la mayoría de los países, y es considerado seguro en niños y mujeres embarazadas. Sin embargo, en el metabolismo de este fármaco, también se ve involucrada simultáneamente con la CYP2D6 otra enzima, la CYP3A4; por lo que los resultados deben ser interpretados con mucho cuidado (Benny y Adithan, 2001).

Tabla 9. Enzimas CYP polimórficas y fármacos testigo utilizados para la medición *in vivo* de su actividad (fenotipificación)

CYP	Fármacos testigo y metabolito generado por la CYP2D6	Criterio de asignación del fenotipo
CYP2D6	Desbrisoquina 4-hidroxidesbrisoquina;	PM = MR $\geq$ 12.6, UEM = MR $\leq$ 0.5
	Dextrometorfán dextrotrófán;	PM = MR $\geq$ 0.3
	Esparteína 2- y 5-dehidroesparteína	PM = MR $\geq$ 20
CYP2C19	Mefenitoina $\log_{10}$ [S-mefenitoina (dosis)]/4'-OH-mefenitoina (orina);	PM = log índice de hidroxilación $\geq$ 1.0
	Mefenitoina s-mefenitoina urinaria / R- mefenitoina urinaria;	PM = proporción S/R $\geq$ 1.0
	Omeprazol $\log_{10}$ omeprazol / 5'-hidroxioimeprazol (plasma)	Índice de hidroxilación $\geq$ 1.0
CYP2E1	Cloroxazona Cloroxazona (dosis) / 6-OH-cloroxazona (8 hr orina)	PM = indefinido
CYP3A4	Eritromicina $^{14}\text{CO}_2$ recobro en aliento seguido por administración I.V. de ^{14}C -N-metileritromicina;	PM = indefinido
	Dapsona hidroxilamina dapsona / dapsona + hidroxilamina dapsona	PM = indefinido

PM: metabolizadores lentos o pobres; UEM: Metabolizador ultraextenso; MR: Proporción metabólica
Tomado de Linder y col., 1997.

En estudios farmacocinéticos, la fenotipificación ha tenido ventajas sobre la genotipificación en revelar interacciones fármaco-fármaco o defectos en el proceso global del metabolismo de fármacos (Linder y col., 1997; Benny y Adithan, 2001); pero por otro lado, la fenotipificación también ha tenido varios inconvenientes debido a que es laboriosa y los protocolos de investigación resultan muy complicados. Se corre el riesgo de que se presenten reacciones adversas al fármaco testigo; surgen problemas en la asignación incorrecta del fenotipo, debido a la co-administración de otros fármacos, y a la confusión de los efectos del fármaco en cierta enfermedad o enfermedades concomitantes (Bordet y col., 1996; Linder y col., 1997; McKinnon y Evans, 2000; Benny y Adithan, 2001). Estos problemas, pueden deberse a la dieta de la persona, y/o a que los individuos o pacientes en estudio, estén recibiendo algún fármaco o fármacos concomitantemente y que sean metabolizados por la CYP2D6 y/o que sean inhibidores de esta enzima (ver **tabla 10**). En

consecuencia, la formación del metabolito del fármaco testigo puede ser reducido a pesar de la actividad enzimática normal, y la proporción metabólica en orina indicaría un metabolizador lento. Tal transformación aparente de un fenotipo EM a un fenotipo PM se denomina fenocopia (Benny y Adithan, 2001).

Tabla 10. Inhibidores de la CYP2D6

Ajmalicina	Ajmalina	Amitriptilina	Amesergida
Aprindina	Budipina	Bufuralol	Cloroquina
Clorpromazina	Cimetidina	Cistiotixene	Citalopram
Clomipramina	Clozepina	Desmetilimipramina	Difenidramina
Flecainida	Fluoxamina	Fluoxetina	Flufenazina
Halofantrina	Haloperidol	Levomepromazina	Metadona
Meclobemida	Olanzapina	Oxprenolol	Paroxetina
Perazina	Perfenazina	Propofenona	Propranolol
Quinidina	Quinina	Ranitidina	Reboxetina
Risperidona	Sertralina	Terbinafina	Terfenadina
Tioridazina	Ticlopidina	Venlafaxina	Yohimbina

Tomado de Benny y Adithan, 2001.

● Genotipificación

La genotipificación del gen *CYP2D6* involucra la identificación de mutaciones genéticas definidas que dan lugar al fenotipo metabolizador, de fármacos y neurotoxinas específicas, al cual pertenece un individuo. Estas mutaciones incluyen alteraciones genéticas que propician una sobre expresión (duplicaciones del gen), una ausencia de un producto proteínico activo (nulidad del alelo), o producción de una proteína mutada con actividad catalítica disminuida (inactivación del alelo) (Benny y Adithan, 2001). La genotipificación provee información sobre los alelos del citocromo P450 que se encuentran presentes, pero requiere de una interpretación exacta y un entendimiento de la relación entre tener algún genotipo y presentar el fenotipo resultante (McKinnon y Evans, 2000).

Para la genotipificación se suele trabajar con el DNA aislado de linfocitos periféricos y comúnmente, se utilizan dos métodos: el método de la PCR-RFLP (fragmentos de restricción de longitud variable) y el de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para un alelo específico (Benny y Adithan, 2001). Generalmente, los laboratorios de diagnóstico y de investigación suelen realizar estas técnicas de manera relativamente fácil y económica (McKinnon y Evans, 2000).

La técnica de PCR, demostró ser un método útil en la detección de mutaciones genéticas asociadas con alteraciones metabólicas de fármacos y neurotoxinas, y/o susceptibilidad a cáncer. En ésta, la región específica del gen de interés es amplificada por PCR seguido por la digestión del producto de DNA amplificado con endonucleasas de restricción. El tamaño de los productos de digestión es evaluado fácilmente por electroforesis en geles de agarosa, tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV (Linder y col., 1997; McKinnon y Evans, 2000; Benny y Adithan, 2001).

En la amplificación de alelos específicos por PCR, se utilizan oligonucleótidos específicos para la hibridación con los alelos comunes y/o mutados en reacciones de amplificación paralela. Sólo el oligonucleótido hibridiza precisamente a la secuencia blanco produciendo el producto de amplificación. El análisis para la presencia u ausencia del producto de amplificación apropiado se logra también por electroforesis en gel de agarosa (Benny y Adithan, 2001).

Las endonucleasas de restricción tienen la capacidad de hacer cortes en las secuencias nucleotídicas de DNA con un alto grado de especificidad. Así, pueden detectarse mutaciones puntuales con endonucleasas de restricción con secuencias de reconocimiento específicas, ya que el DNA de interés sirve como sustrato para tal endonucleasa. Este estudio es rutinario en la comparación del tamaño de los productos generados por digestión de los sustratos de DNA amplificados por PCR, a partir de el DNA genómico de sujetos control vs. los DNAs genómicos de sujetos en estudio (casos). Las diferencias en el tamaño de los fragmentos nucleotídicos generados de la digestión con endonucleasas de restricción, son referidas comúnmente como fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP) (Linder y col., 1997).

El mejor ejemplo de esta técnica en la genotipificación del gen *CYP2D6*, es la identificación de los polimorfismos *CYP2D6**A y *CYP2D6**B, las cuales se analizaron en este trabajo y se describirán más adelante.

Este método de genotipificación requiere pequeñas cantidades de sangre o tejido (Bowie y col., 1994), no se afecta por enfermedades subyacentes o por ingesta de fármacos por parte del paciente, y provee resultados dentro de las 48 a 72 horas posteriores a la toma de muestra,

permitiendo una terapia adecuada (Benny y Adithan, 2000). Sin embargo, los métodos basados en PCR se limitan en la necesidad de detectar el número de variaciones alélicas del citocromo P450 que va incrementándose día a día (McKinnon y Evans, 2000), siendo más de 30 alelos diferentes del *CYP2D6* y 55 variaciones de estos los que han sido identificados hasta ahora (Benny y Adithan, 2001). Una lista de alelos del *CYP2D6* se muestran en la página Web: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>. Sin embargo, esto parece depender del grupo étnico, la genotipificación de solo 5-6 alelos no funcionales, han predicho el fenotipo *CYP2D6* con aproximadamente el 95-99% de certeza. Por ejemplo, la variación alélica *CYP2D6* más común en población de Caucásicos, Chinos/Japoneses y Africanos negros/Afro-americanos, es la *CYP2D6**4, *10 y *17, respectivamente (Benny y Adithan, 2001).

Existen otros métodos, para innovaciones futuras de la determinación del genotipo basadas en la tecnología conocida como *microarreglos*. Un ejemplos de tal tecnología, son los chips del gen *CYP2D6*, recientemente introducidos por Affymetrix en los Estados Unidos. Estos chips copian sintéticamente rasgos de identificación de los alelos P450 inmovilizados dentro de un soporte sólido utilizando tecnología de fotolitografía, ofreciendo la potencia y la precisión para genotipar grandes poblaciones con respecto a todos los genes P450 clínicamente relevantes (McKinnon y Evans, 2000).

2.3 Estudios que han investigado la asociación del CYP2D6 con la etiología de la EP

Como ya se mencionó, Barbeau y colaboradores en el año de 1985 fueron los primeros en sugerir que los MP tienen mayor susceptibilidad a desarrollar EP como resultado de la detoxificación lenta de neurotoxinas por la deficiencia del citocromo 4-hidroxilasa de desbrisoquina; esta hipótesis fue apoyada por estudios farmacocinéticos. Sin embargo, investigaciones posteriores por análisis genotípico del *CYP2D6* (análisis molecular de DNA) han sido contradictorias.

Armstrong y colaboradores en el año de 1992 evaluaron 15 genotipos de *CYP2D6* en 53 pacientes con EP y 72 controles sanos de origen caucásico, por medio de PCR y PCR-RFLP, encontrando que el alelo *CYP2D6*B* (*CYP2D6*4*) es dos veces más frecuente en pacientes que en controles, con un riesgo relativo aproximado del 2.7 (IC95% 1.14-6.41; $p = 0.0063$) para los sujetos con fenotipo homocigoto y heterocigoto para este alelo. En ese mismo año, Smith y colaboradores reportaron que individuos con un defecto metabólico en el gen del citocromo P450 *CYP2D6*-desbrisoquina hidroxilasa con fenotipo metabolizador pobre, presentaban un incremento de riesgo de 2.54 (IC95% 1.51-4.28) de presentar la enfermedad de Parkinson (estudiando el alelo *CYP2D6*4* en 229 pacientes y 720 controles de raza caucásica).

En el año de 1994 Planté-Bordeneuve y colaboradores, no encontraron diferencias estadísticamente significativas, al estudiar los alelos *CYP2D6*A* y **B* (**3* y **4*) en 48 pacientes con EP familiar de 22 familias Británicas e Irlandesas, y 88 controles (familiares de los pacientes que no presentaban la EP). En 1996, Bordet y colaboradores, confirmaron estudios similares al de Planté-Bordeneuve, los cuales concluían que el locus *CYP2D6* no era el mejor para determinar la susceptibilidad genética en la EP idiopática (EPI), debido a las frecuencias nulas y muy bajas de los alelos *CYP2D6*3* y **4* encontradas en sus poblaciones de estudio. Aunque Bordet y sus colaboradores precisan, que estos resultados pueden deberse a errores en su metodología; ya que por ejemplo, ellos estudiaron los alelos **3* y **4* en 105 pacientes con EPI y 105 controles de origen

francés; solo que sus controles fueron seleccionados en un hospital de Francia que presentaban bronquitis crónica. En la **tabla 11** se resumen los principales estudios al respecto.

Tabla 11. Estudios que han investigado la asociación del gen *CYP2D6* con la etiología de la EP en diferentes poblaciones

Población	Alelos estudiados	Asociación No / Sí	Casos N	Controles N	RM (IC 95%)
Caucásicos (Armstrong y col., 1992)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B <i>CYP2D6</i> *D <i>CYP2D6</i> *E	Sí (*B)	53	72	2.7 (1.14-6.41)
Caucásicos (Smith y col., 1992)	<i>CYP2D6</i> *B	Sí (*B)	229	720	2.54 (1.51-4.28)
Británicos e Irlandeses (Planté-Bordeneuve y col., 1994)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B	No	48	88	NS
Franceses (Bordet y col., 1996)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B	No	105	105	NS
Alemanes (Gaser y col., 1996)	<i>CYP2D6</i> *B	No	115	73	NS
Caucásicos de EEUU (Sandy y col., 1996)	<i>CYP2D6</i> *B	No	108	236	NS
Caucásicos australianos (McCann y col., 1997)	<i>CYP2D6</i> *B	Sí (*B)	112	206	1.7 (0.94-2.45)
Bélgica, Luxemburgo (Diederich y col., 1997)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B	No	80	108	NS
New York city, EEUU (Wilhelmsen y col., 1997)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B	Sí (*B)	121	138	2.52
Chinos de Hong Kong (Chan y col., 1998)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B	No	215	313	NS
Residentes del Pacífico Norte de EEUU (Payami y col., 2001)	<i>CYP2D6</i> *B	No	576	247	NS
Navarra, España (Guerrero y col., 2002)	<i>CYP2D6</i> *A <i>CYP2D6</i> *B <i>CYP2D6</i> *T <i>CYP2D6</i> *G	No	46	54	NS

*CYP2D6**A = *3; *CYP2D6**B = *4; *CYP2D6**G = *8; *CYP2D6**T = *6
RS = Razón de Momios; IC = Intervalos de Confianza; NS = No significativo.

III. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia del genotipo metabolizador lento del tipo *CYP2D6* y su posible efecto como factor de susceptibilidad en la etiología de la enfermedad de Parkinson en población mestiza mexicana.

3.2 Objetivos Particulares

- ❖ Establecer la frecuencia genotípica y alélica de los alelos no funcionales *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4 relacionados con el fenotipo metabolizador lento, y del alelo funcional *CYP2D6**1 (tipo silvestre), en 50 pacientes con enfermedad de Parkinson pertenecientes a la población mestiza mexicana.

- ❖ Establecer la frecuencia genotípica y alélica de los alelos no funcionales *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4, relacionados con el fenotipo metabolizador lento, y del alelo funcional *CYP2D6**1 (tipo silvestre), en 50 personas mestizo mexicanas mayores de 50 años que no tengan indicios de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa.

- ❖ Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en los pacientes con EP y en los voluntarios mayores de 50 años (grupo control), para determinar la posible asociación de los alelos no funcionales del *CYP2D6* con la etiología de la EP.

IV. Justificación

4. Justificación

Hasta la fecha en México no se ha reportado ningún estudio acerca de los polimorfismos del gen *CYP2D6* en su población mestiza mexicana, por lo que la identificación de los alelos mutantes en pacientes con enfermedad de Parkinson permitirá analizar uno de los factores de riesgo relacionados con la etiología de la enfermedad de Parkinson.

Este estudio pretende determinar la frecuencia del alelo funcional tipo silvestre *CYP2D6**1 y de los alelos no funcionales *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4 en población mestiza mexicana, con Parkinson y mayor de 50 años, para determinar la posible asociación de los alelos no funcionales del gen *CYP2D6* con la etiología de la EP.

V. Desarrollo Experimental

5.1 Población estudiada

Se incluyeron 61 pacientes con enfermedad de Parkinson (diagnosticados en la Clínica de Discinesias en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez de la Ciudad de México). Los resultados obtenidos de los pacientes se estudiaron y compararon en forma paralela con los resultados de 131 voluntarios mayores de 49 años aparentemente sanos y sin rasgos de presentar ninguna enfermedad neurodegenerativa (grupo control). Todos los pacientes en este estudio firmaron hoja de consentimiento informado (**cuadro 1**).

5.2 Criterios de inclusión y exclusión de la población estudiada

5.2.1 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de pacientes

Se incluyeron pacientes mexicanos (al menos dos generaciones), diagnosticados con la enfermedad de Parkinson en la clínica de Discinesias en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN). Cabe mencionar, que solo se incluyeron a los pacientes que firmaron la hoja de consentimiento en donde se les informó el objetivo y la importancia de este estudio.

Se excluyeron todos los pacientes que no presenten la enfermedad de Parkinson y que no provenían de familias mexicanas, en otras palabras, que no tuvieran padres y abuelos mexicanos; al igual que todos los pacientes que no quisieron participar en este estudio y que no firmaron la carta de consentimiento.

5.2.2 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo control

Se incluyeron personas mexicanas (al menos dos generaciones) y mayores de 49 años sin ningún indicio de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa, y que aceptaron participar en este estudio. Todos ellos firmaron la hoja de consentimiento en donde se les informó el objetivo y la importancia del estudio.

Cuadro 1. Carta de consentimiento informado

	INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA MANUEL VELASCO SUAREZ	INSURGENTES SUR No. 3877 C.P. 14280 MEXICO, D.F. TEL. 5404-3822
ESTUDIO FARMACOGENÓMICO EN POBLACIÓN MEXICANA NORMAL Y EN PACIENTES NEUROPSIQUIATRICOS		
1.- Me han informado que en el Departamento de Neurogenética y Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) están realizando junto con el Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana un estudio para investigar como se transforman algunos medicamentos en el organismo y que variantes hereditarias tienen los genes que producen las sustancias (proteínas) que intervienen en la transformación de dichos medicamentos en la población mexicana. 2.- Se me ha informado que mi participación en este estudio es voluntaria, si soy paciente del I.N.N.N. y si no deseo colaborar en este estudio en nada se afectara la atención que el Instituto me proporciona. 3.- Si acepto participar se me pedirá que después de orinar a las 10.00 PM (10 de la noche) tomaré 10 ml de un jarabe que me darán ya medido que contienen 30 mg de dextrometorfán con un vaso de agua. Este jarabe se usa habitualmente para el tratamiento de la tos. Colectaré la orina durante las 8 horas posteriormente a la toma del jarabe en frascos de vidrio color ámbar que me proporcionará el Instituto. Esta orina la entregará a la mañana siguiente de su recolección en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología del I.N.N.N. 4.- Al entregar la muestra de orina me tomarán una muestra de sangre de 20 ml para extraer el DNA que es el material hereditario. No necesito ir en ayunas para esta toma de sangre. 5.- He sido informado que las agujas y tubos con los cuales se me tomará la sangre son desechables, y que no recibiré ningún resultado pues este proyecto aún está en etapa de investigación. 6.- Se me informó que el dextrometorfán es un jarabe que ha sido ampliamente usado desde hace muchos años en millones de personas. 7.- Riesgos: Ocasionalmente el dextrometorfán puede causar náuseas, vómito, erupciones cutáneas, trastornos gastrointestinales, excitación, somnolencia y en dosis repetidas y mayores puede causar depresión nerviosa y dificultad para respirar. 8.- He sido informado que puedo abandonar el estudio en el momento que yo desee. 9.- Se me ha informado que para cualquier duda o aclaración respecto a este estudio puedo comunicarme al 56 06 38 22 con la Dra. Ma. Elisa Alonso y Dra. Marisol López López a la extensión 2022, con la Dra. Heigl Jung a la extensión 2017 y con el Q.F.B. Jorge Guerrero a la extensión 2018. 10.- Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio de mi caso sea comunicada a la comunidad médica verbalmente o por escrito, pero sin revelar mi identidad. 11.- He leído esta forma de consentimiento, me han aclarado las dudas que he tenido acerca del estudio y he decidido aceptar en participar en esta investigación.		
Fecha: _____		
Nombre del participante: _____		
Firma del participante: _____		
Nombre del responsable del paciente en caso de incapacidad del paciente _____		
Firma del responsable del paciente en caso de incapacidad del paciente _____		
Nombre Testigo: _____		
Firma Testigo: _____		
Nombre Testigo: _____		
Firma Testigo: _____		

Cuadro 1. Continuación ...

		INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA MANUEL VELASCO SUAREZ		INSURGENTES SUR No. 3877 C.P. 14260 MEXICO, D.F. TEL 5606-3822
		DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR UTILIZANDO DEXTROMETORFANO		
VOLUNTARIO No. _____		No. de Registro _____		
NOMBRE DEL VOLUNTARIO: _____				
NOMBRE COMPLETO				
INICIALES: _____				
EDAD: _____	SEXO: _____	PESO: _____	GRUPO SANGUINEO: _____	
NACIONALIDAD: _____				
LUGAR DE NACIMIENTO: CIUDAD _____		ESTADO _____	PAÍS: _____	
FECHA Y HORA REAL DE LA ADMINISTRACIÓN: _____				
VOLUMEN DE DEXTROMETORFANO: _____				
VOLUMEN DE ORINA RECOLECTADA: _____				
FECHA DE ANÁLISIS DE LA MUESTRA: _____				
Conteste el siguiente cuestionario:				
1.- La semana previa al estudio, ¿estuvo bajo tratamiento con algún medicamento?, si su respuesta es sí indique por favor el nombre de dicho medicamento. _____				
2.- ¿Ha ingerido pastillas anticonceptivas o algún tratamiento hormonal en los últimos días? _____				
3.- ¿Es fumador?, si su respuesta es sí indique por favor el número de cigarros que se fuma diario. _____				
4.- ¿Ingiera bebidas alcohólicas, café o té?, si su respuesta es sí indique con que frecuencias los consume. _____				
5.- Mencione el lugar de nacimiento de sus siguientes familiares:				
Madre:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	
Padre:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	
Abuelo Paterno:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	
Abuela Paterna:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	
Abuelo Materno:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	
Abuela Materna:	Ciudad _____	Estado _____	País _____	

Se excluyeron a todas las personas menores de 49 años y a todas aquellas que presentaran alguna enfermedad neurodegenerativa y/o que no provenían de familias mexicanas, en otras palabras, que no tuvieran padres y abuelos mexicanos, al igual que todos aquellos que no quisieran participar en este estudio y que no firmaron la carta de consentimiento.

NOTA: No se tomó en cuenta el sexo tanto en pacientes como en controles, ya que es irrelevante para el análisis genotípico.

5.3 Determinación del polimorfismo *3 y *4 del gen *CYP2D6*

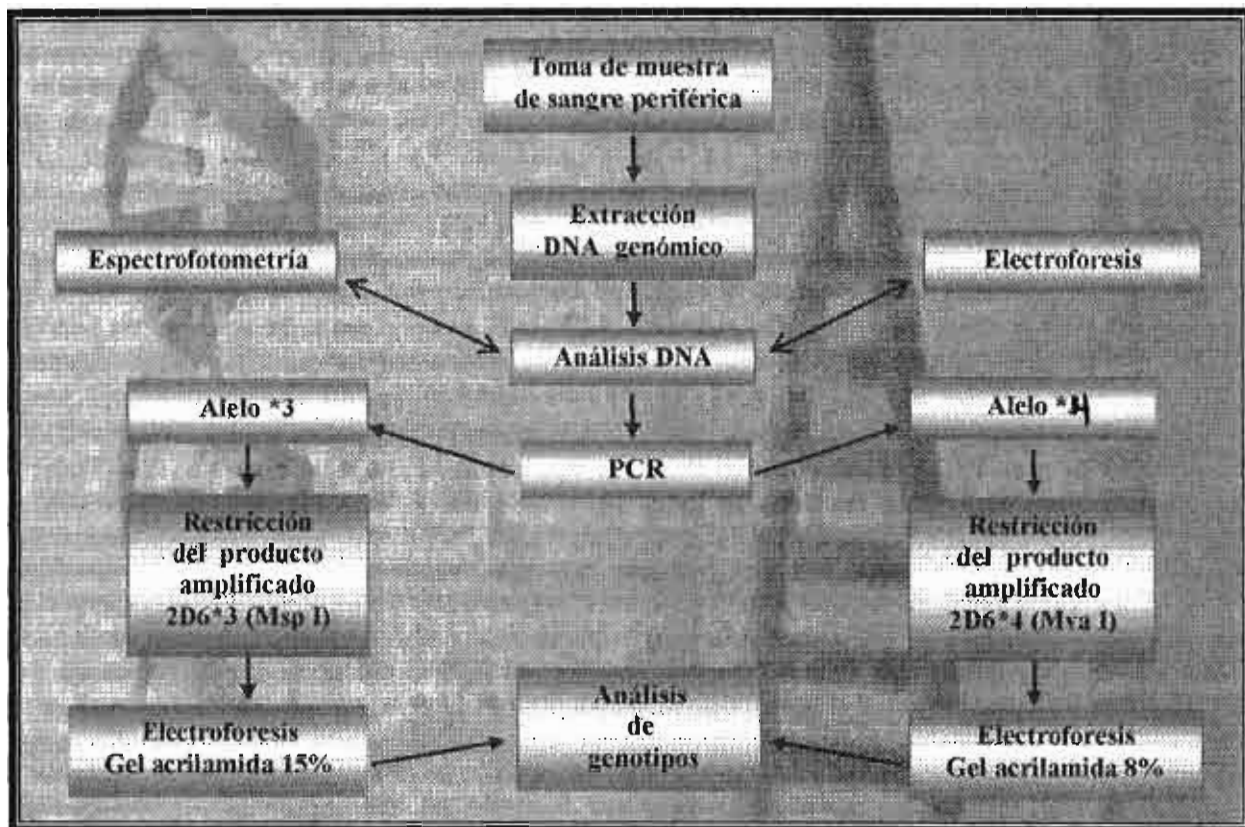
Se creó un banco de DNA de pacientes con enfermedad de Parkinson (casos) y de individuos que no presentaban rasgos de alguna enfermedad neurodegenerativa mayores de 49 años (controles). Tanto el grupo de casos como el de controles pertenecen a la población mestiza mexicana. La metodología que se siguió para la determinación del polimorfismo *3 y *4 del gen *CYP2D6* se muestra en el **esquema 1**.

Las técnicas que se utilizaron para la extracción del DNA genómico, así como de PCR, RFLPs y las distintas electroforesis que se implementaron en esta investigación tanto para la determinación del polimorfismo *CYP2D6**3 como para el *CYP2D6**4, se describen de manera sucesiva e independiente a continuación.

5.4 Extracción de DNA genómico

5.4.1 Método de extracción de DNA genómico por la técnica de sales-fenol-cloroformo

A partir de 20 ml de sangre periférica empleando ACD (ácido cítrico dextrosa) como anticoagulante y con la ayuda del amortiguador RCLB (TRIS 1M pH7, MgCl₂ 1M, NaCl 5M, H₂O desionizada estéril) se obtuvo el paquete de leucocitos; de los cuales, se llevó a cabo la extracción del DNA genómico empleando el método de extracción de sales-fenol-cloroformo (Maniatis, 4th ed; Schur y col., 2001), como se describe en el **esquema 2**:



Esquema 1. Diagrama de flujo que representa el orden en que se realizaron las técnicas empleadas en esta investigación

Equipo

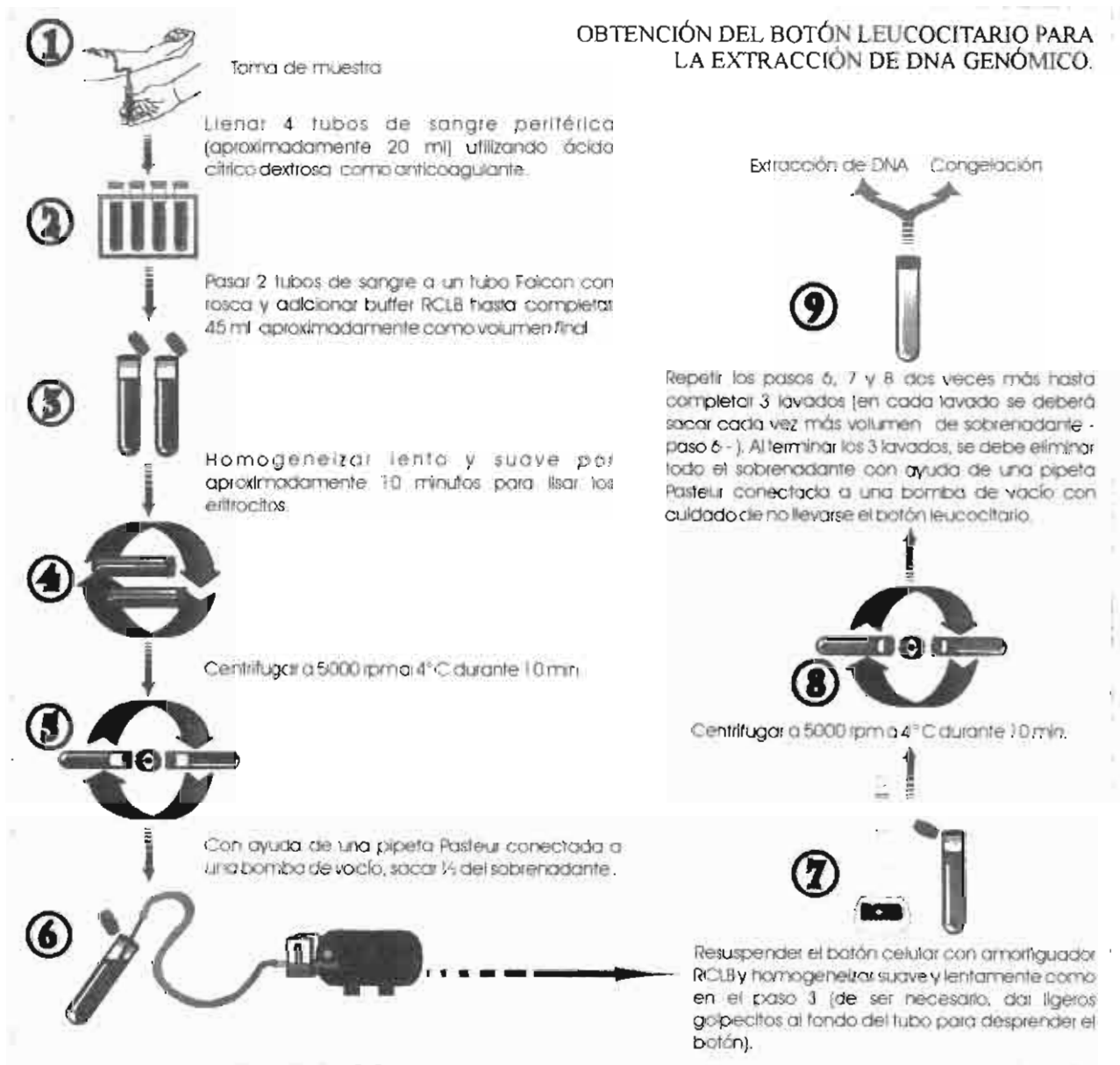
- Equipo para punción venosa
- Guantes de látex estériles
- Tubos falcon estériles de 50 ml con tapón de rosca
- Centrífuga con refrigeración y rotor para tubos falcon de 50 ml y microtubos de 1.5 ml
- Bomba de vacío con filtro acoplada a una trampa para coleccionar desechos biológicos líquidos
- Microtubos estériles de 1.5 ml
- Micropipeta de 1000 µl con puntas estériles
- Pipetas de transferencia estériles de 3 ml
- Centrífuga con vacío, extractor de solventes orgánicos y calentamiento
- Baño maría
- Refrigerador

Reactivos

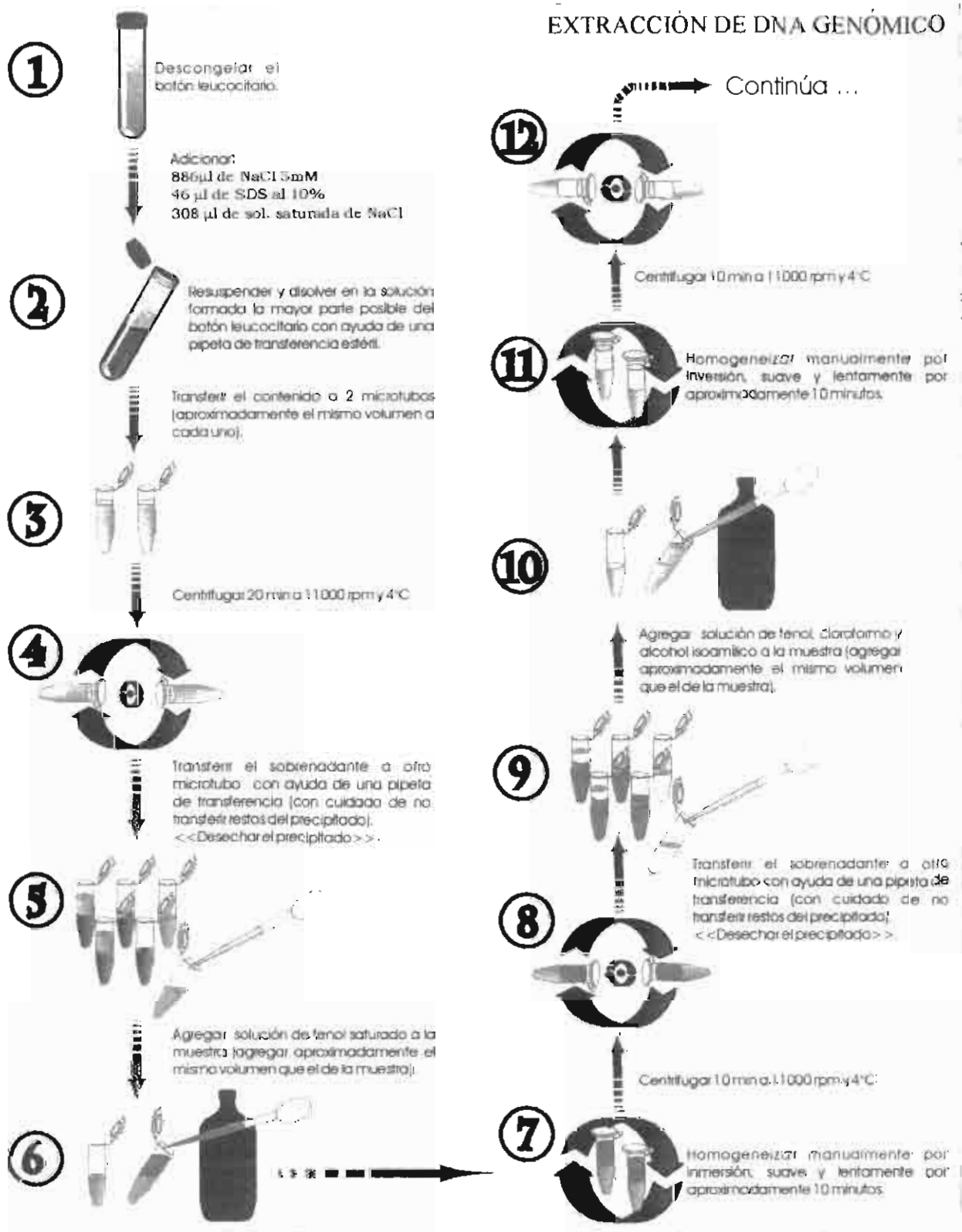
- Ácido cítrico dextrosa (anticoagulante)
- Amortiguador de lisis RCLB (Tris [1M] pH 7.6; NaCl [5M]; MgCl₂ [1M])
- NaCl [5mM]

- SDS [10%]
- Solución saturada de NaCl
- Solución de fenol saturado
- Solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico [25:24:1]
- Solución de cloroformo y alcohol isoamílico [24:1]
- Iso-propanol frío [Absoluto]
- Etanol frío [70%]
- Agua grado inyectable

Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de *sales-fenol-cloroformo* (1 de 5)



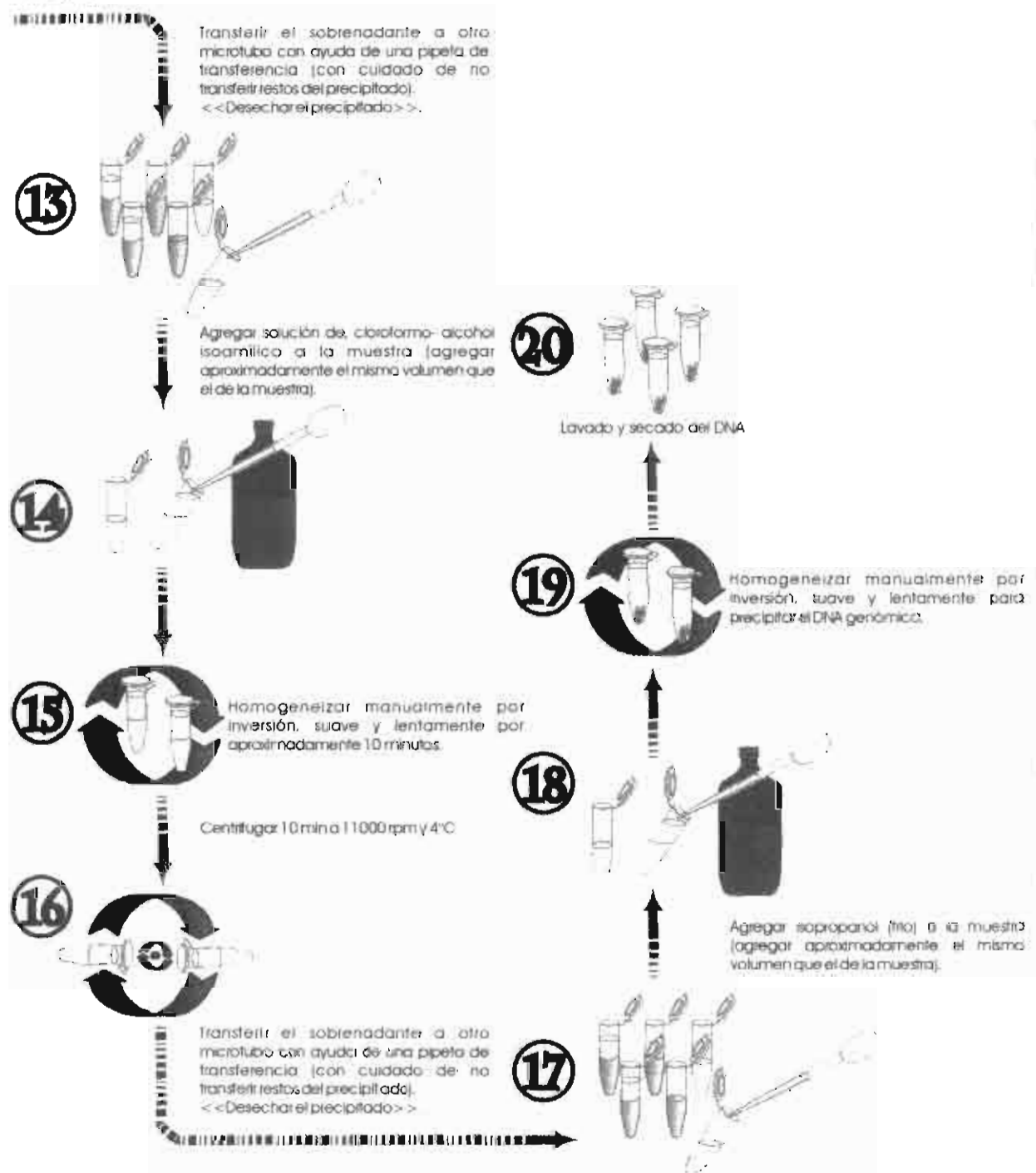
Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de *sales-phenol-chloroform* (Continuación: 2 de 5)



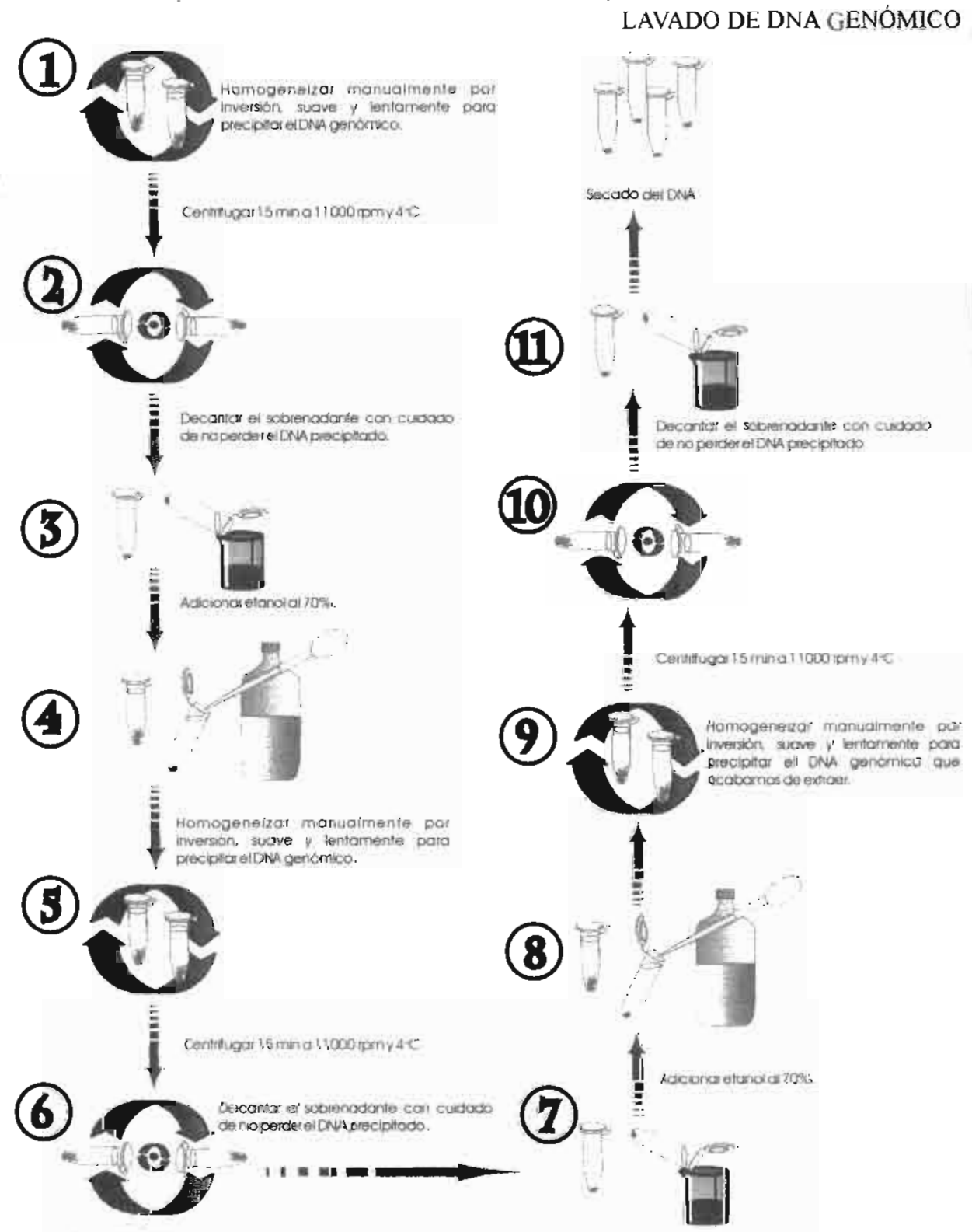
Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de *sales-fenol-cloroformo* (Continuación: 3 de 5)

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

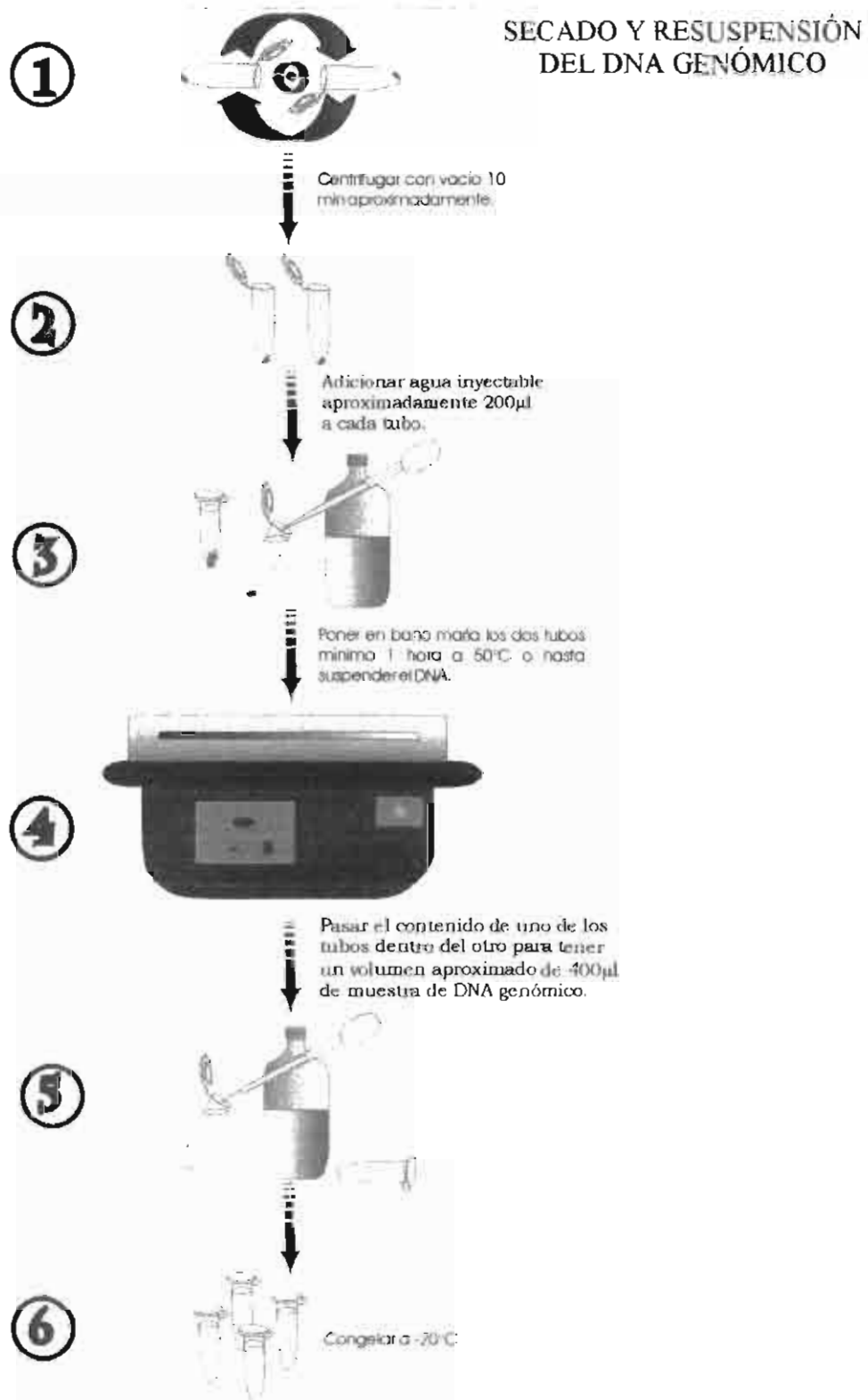
... Continuación



Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de *sales-fenol-cloroformo* (Continuación: 4 de 5)



Esquema 2. Protocolo de extracción de DNA genómico por el método de *sales-fenol-cloroformo* (Continuación: 5 de 5)



5.4.2 Método de extracción de DNA genómico por columna *QIAamp® DNA Blood Midi Kit de QIAGEN®*

A partir de 2 ml de sangre periférica empleando ACD (ácido cítrico dextrosa) como anticoagulante y con la ayuda del Kit de QIAGEN® se llevó a cabo la extracción del DNA genómico empleando el método de extracción por columna, como se describe en el **esquema 3**:

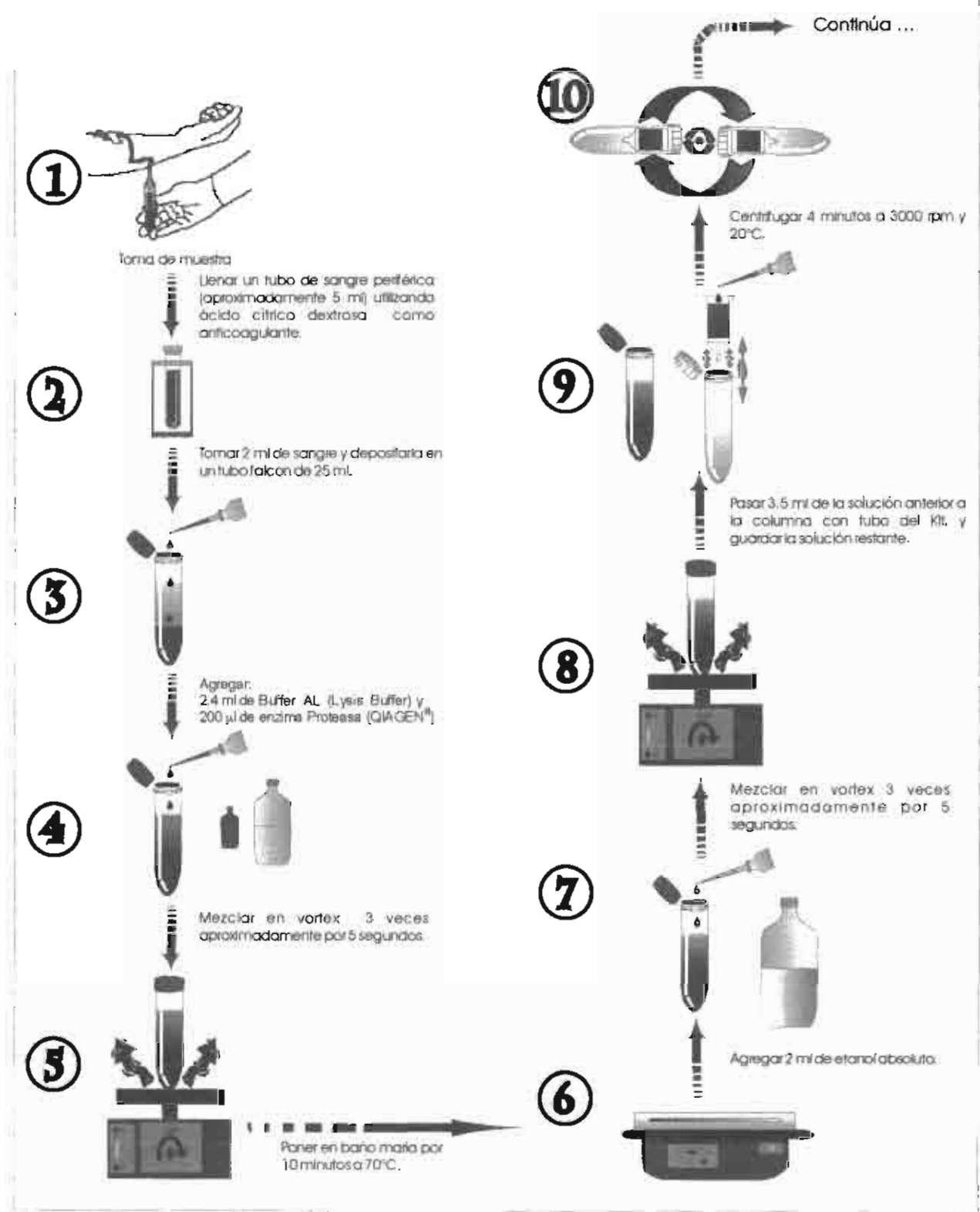
Equipo

- Equipo para punción venosa
- Guantes de látex estériles
- QIAamp® DNA Blood Midi Kit de QIAGEN®
- Tubos falcon estériles de 15 ml con tapón y rosca
- Centrífuga con refrigeración y rotor para tubos falcon de 50 ml con capuchones para tubos de 15 ml
- Microtubos estériles de 1.5 ml
- Micropipeta de 1000 µl y 5ml con puntas estériles
- Pipetas de transferencia estériles de 3 ml
- Vortex
- Baño maría
- Refrigerador

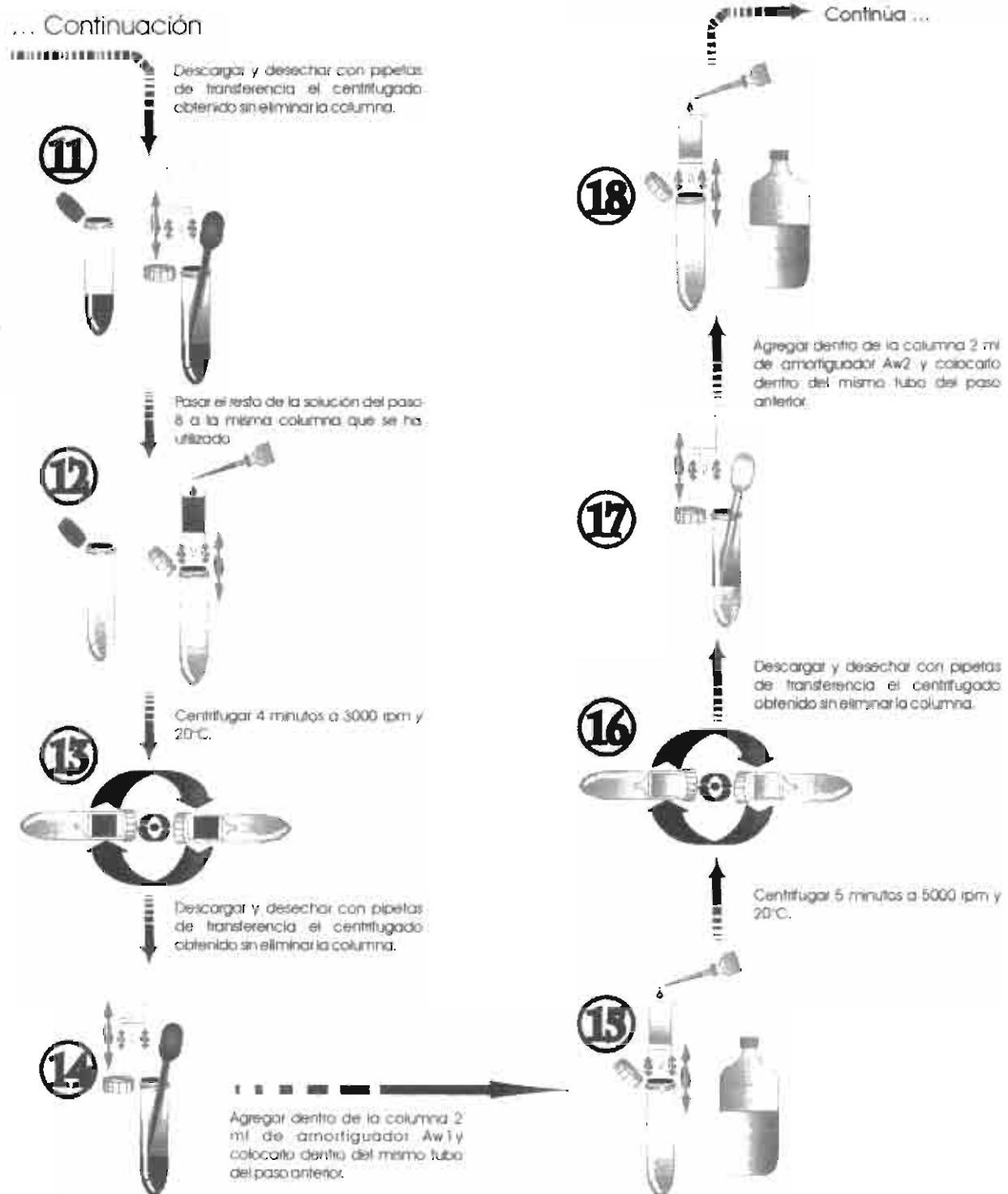
Reactivos

- Ácido cítrico dextrosa (anticoagulante)
- Amortiguador AL (Lysis Buffer) de QIAGEN®
- Proteasa de QIAGEN®
- Amortiguador AW 1 de QIAGEN®
- Amortiguador AW 2 de QIAGEN®
- Amortiguador AE (Elution Buffer) de QIAGEN®
- Etanol absoluto
- Agua grado inyectable

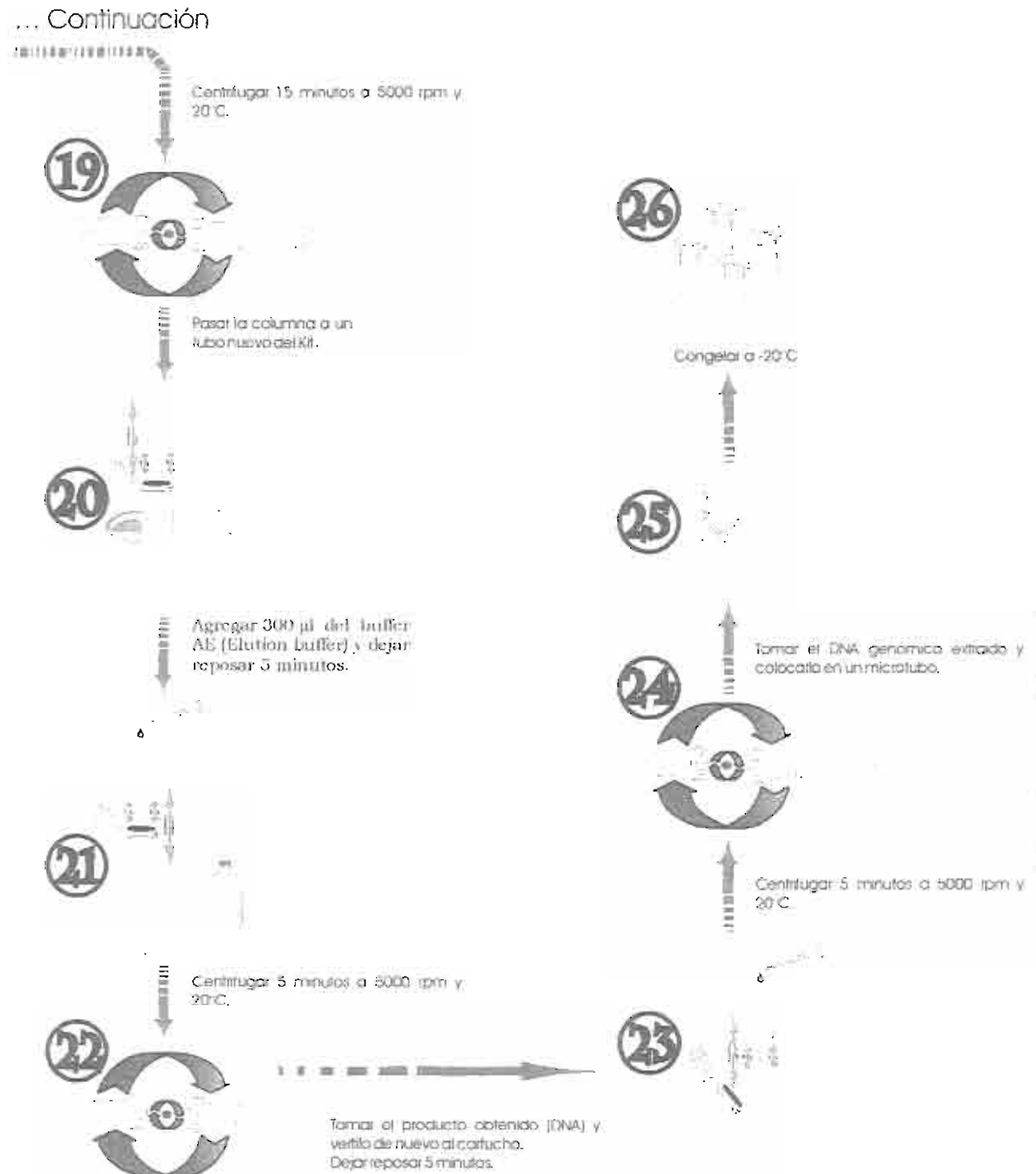
Esquema 3. Protocolo de extracción de DNA genómico por columna QIAamp® DNA Blood Midi Kit de QIAGEN® (1 de 3)



Esquema 3. Protocolo de extracción de DNA genómico por columna QIAamp® DNA Blood Midi Kit de QIAGEN® (Continuación: 2 de 3)



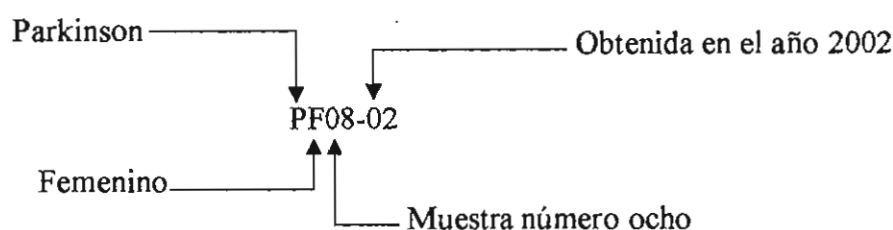
Esquema 3. Protocolo de extracción de DNA genómico por columna QIAamp® DNA Blood Midi Kit de QIAGEN® (Continuación: 3 de 3)



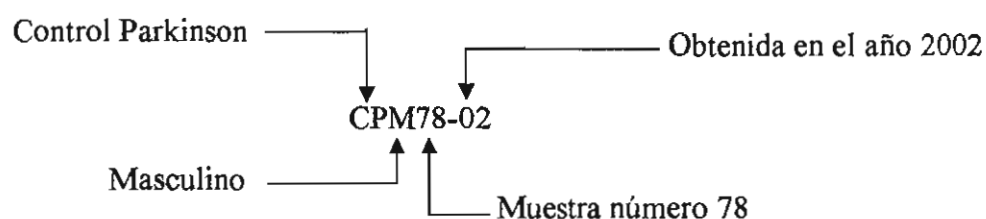
5.5 Análisis espectrofotométrico y electroforético de DNA genómico

Todas las muestras de DNA genómico se procesaron de la siguiente manera:

A las muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson se les asignó una clave de identificación que consistía de la letra P (Parkinson), seguida de la letra F o M de acuerdo al género del paciente y un número progresivo que refiere el número de muestra correspondiente, un guión y el año en curso de obtención de la muestra; por ejemplo:



Por otra parte, a las muestras del grupo control se les asignó una clave de identificación diferente, que consistía de las letras CP (control Parkinson), seguida de la letra F o M de acuerdo al género del paciente y un número progresivo que refiere el número de muestra correspondiente, un guión y el año en curso de obtención de la muestra; por ejemplo:



6.5.1 Análisis espectrofotométrico del DNA genómico

Cada muestra de DNA genómico extraído por las técnicas antes señaladas, tanto para controles como para pacientes, se analizaron por espectrofotometría en el rango U.V. y se tomaron lecturas a 2 diferentes longitudes de onda: a λ 260 nm se cuantificó el DNA genómico y a λ 280 nm se midieron las proteínas presentes en la muestra para obtener la pureza del DNA genómico extraído.

Para este análisis se tomó una alícuota de 10 µl de cada muestra y se llevó a un volumen de 1000 µl con agua grado inyectable, procediéndose a leer en una celda de cuarzo limpia y sin ralladuras a las longitudes de onda ya señaladas.

La concentración de DNA se calculó mediante la formula:

$$[\text{DNA}]^{\text{ng}/\mu\text{l}} = (\text{Absorbancia a 260 nm}) (\text{FD}) (\text{FC})$$

donde:

Absorbancia a 260 nm = adimensional

FD = factor de dilución (adimensional)

FC = factor de conversión ($\text{ng}/\mu\text{l}$)

Debido a que se tomó una alícuota de 10 µl de cada una de las muestras de DNA genómico extraído y se llevaron a un volumen final de 1000 µl con agua grado inyectable, el factor de dilución es igual a 100; y ya que una densidad óptica de DNA genómico es igual a 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, el factor de conversión es igual a 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Sambrook, 1989).

La relación de las $\lambda^{260/280}$ determina la pureza de las muestras de DNA genómico extraídas; esta relación se deberá encontrar en el rango de 1.8 a 2.0 para considerarse como óptima (Sambrook, 2^{da} ed).

5.5.2 Análisis electroforético del DNA genómico

Se analizaron por electroforesis las muestras de DNA genómico, tanto de pacientes como de controles, tomando alícuotas de 4 µl de DNA genómico las cuales se mezclaron con 4 µl de colorante para geles no desnaturizantes y se corrieron a 120 V en geles de agarosa al 0.8 % con amortiguador TBE 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta para observar la integridad del DNA genómico extraído (Maniatis, 1982; Schur y col., 2001).

5.6 Genotipificación de CYP2D6

Se emplearon las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) así como de fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP). La combinación de PCR-RFLP permitió determinar el patrón tipo silvestre, el patrón de alelos mutantes heterocigotos y el patrón de alelos mutantes homocigotos tanto para el alelo *CYP2D6*3* como para el *CYP2D6*4*, utilizando para ello los oligonucleótidos y las enzimas de restricción específicas para este fin.

5.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificaron por PCR las regiones específicas que flanquean las mutaciones para los alelos *CYP2D6*3* (*A₂₆₃₇*) y *CYP2D6*4* (*G_{1934A}*) a partir del DNA genómico extraído de cada paciente y voluntario control del estudio, para esto, se emplearan los oligonucleótidos 2D6-3A, 2D6-3B, 2D6-4A y 2D6-4B respectivamente [200 ng/ μ l] (ver **tabla 12**), Taq PCR Master MIX Kit (QIAGEN[®]) [2.5 U/ μ l Taq DNA polimerasa, amortiguador 1x QIAGEN PCR con MgCl₂ 15 mM, 200 μ M de dNTP], DMSO 5% (dimetil-sulfóxido) y agua grado inyectable (tomando en cuenta las condiciones del proveedor) así como una concentración de 100 ng/ μ l de cada oligonucleótido y una concentración mayor o igual a 50 ng/ μ l de DNA genómico en un volumen final de 30 μ l y 15 μ l de reacción respectivamente, y se trabajo siempre en una campana de flujo laminar y utilizando guantes de látex estériles, ver **tabla 13**.

Tabla 12. Secuencia de los oligonucleótidos y enzimas de restricción empleadas para la determinación genotípica de los alelos de CYP2D6

Oligonucleótidos	Secuencia	Enzima de restricción
CYP2D6 * 3		
2D6*3 A	5'- GAT GAG CTG CTA ACT GAG CC -3'	Msp I
2D6*3 B	5'- CCG AGA GCA TAC TCG GGA C -3'	
CYP2D6 * 4		
2D6*4 A	5'- GCC TTC GCC AAC CAC TCC G -4'	Mva I
2D6*4 B	5'- AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC -3'	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador PCR System 9600 Gene Amp EPPENDORF Mastercycler Gradient. Las condiciones de reacción para *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4*,

así como para las subsecuentes reacciones de amplificación fueron las que se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 13. Mezcla por reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés en la determinación genotípica de los alelos *3 y *4 del *CYP2D6*

Mezcla	<i>CYP2D6</i> *3	<i>CYP2D6</i> *4
DNA [$\geq$ de 50 ng/ μ l]	3 – 8.5 μ l	3 – 8.5 μ l
2D6*3 A [100 ng/ μ l]	2.0 μ l	----
2D6*3 B [100 ng/ μ l]	2.0 μ l	----
2D6*4 A [100 ng/ μ l]	----	2.0 μ l
2D6*4 B [100 ng/ μ l]	----	2.0 μ l
Master MIX Kit QIAGEN®	15.0 μ l	15.0 μ l
DMSO [5 %]	1.5 μ l	1.5 μ l
Agua grado inyectable	c.b.p. 30.0 μ l	c.b.p. 30.0 μ l

Tabla 14. Condiciones de amplificación para los pares de oligonucleótidos

Alelos	Condiciones		
	Desnaturalización prol.	Desnaturalización, alineamiento y extensión	Extensión prol.
CYP2D6 * 3	94° 5 min	94° 1 min, 58° 1 min, 72° 1.5 min (40 ciclos)	72° 10 min
CYP2D6 * 4	94° 5 min	94° 1 min, 60° 1 min, 72° 1.5 min (30 ciclos)	72° $\leq$ 10 min

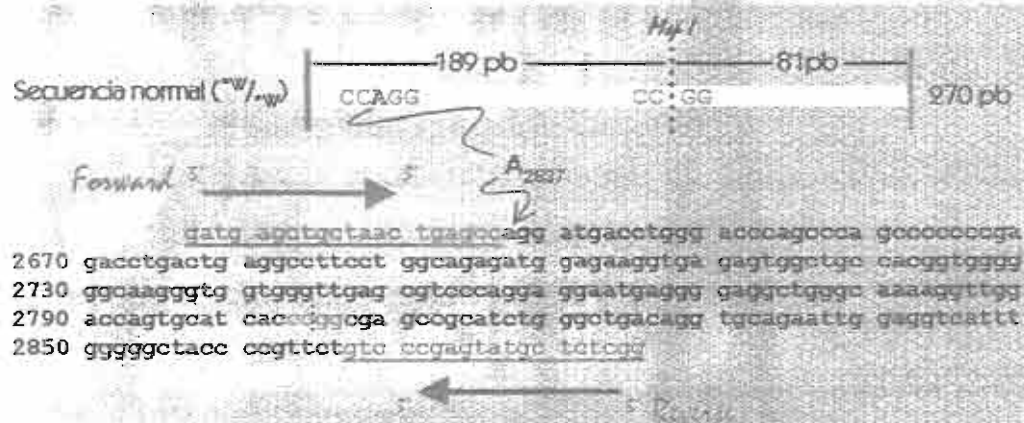
En los **cuadros 2 y 3** se esquematizan los productos amplificados por PCR tanto para el alelo *3 como para el *4, al igual que la secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados en cada alelo.

5.6.2 Análisis electroforético del producto de amplificación de la PCR

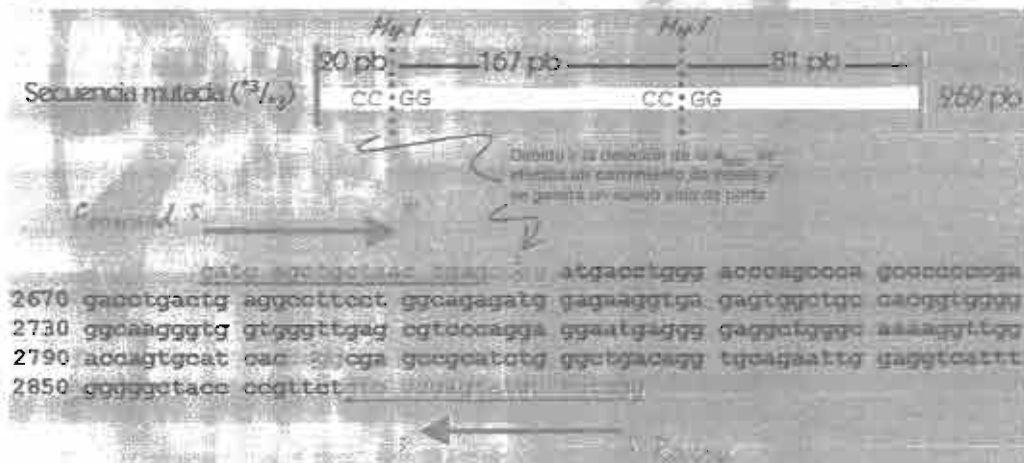
Se analizaron por electroforesis los productos de la reacción de PCR de los alelos *3 y *4 del *CYP2D6* tanto de pacientes como de controles tomando alícuotas de 3 μ l del producto de PCR y se mezclaron con 4 μ l de colorante para geles no desnaturalizantes y se corrieron a 120 V en geles de agarosa al 3 % con amortiguador TBE 0.5X; los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta (Bernard y col., 2001; Maniatis, 1982; Schur y col., 2001).

Polimorfismo CYP2D6*3 (Delección de la A₂₈₃₇ en el exón 5)

a)



b)



■ Oligonucleótido 2D6 *3A

■ Oligonucleótido 2D6 *3B

⋮ Sitio de corte Hsp I (CCAGG)

Cuadro 2. Esquematización del producto amplificado por PCR para el alelo CYP2D6*3 donde se muestran los sitios de corte específicos de la enzima de restricción *Msp* I empleada sobre la secuencia amplificada y los fragmentos esperados característicos para un homocigoto mutado ($3/3$) como para un homocigoto normal (w/w). Cabe mencionar, que los fragmentos esperados para un heterocigoto ($w/3$) son las combinaciones de los fragmentos generados tanto en un homocigoto mutado como en un homocigoto normal, dando un total de 4 fragmentos diferentes (189pb, 167pb, 81pb y 20pb).



Cuadro 3. Esquematización del producto amplificado por PCR para el alelo CYP2D6*4 donde se muestran los sitios de corte específicos de la enzima de restricción Mva I empleada sobre la secuencia amplificada y los fragmentos esperados característicos para un homocigoto mutado (*4/*4) como para un homocigoto normal (*w/*w). Cabe mencionar, que los fragmentos esperados para un heterocigoto (*w/*4) son las combinaciones de los fragmentos generados tanto en un homocigoto mutado como en un homocigoto normal, dando un total de 3 fragmentos diferentes (355pb, 250pb, y 105pb).

5.6.3 Fragmentos polimórficos de restricción de longitud variable (RFLP)

Restricción enzimática

Posterior a la amplificación, tanto para pacientes como para controles, los productos de las PCR fueron digeridos con su correspondiente enzima de restricción, ver **tabla 15**.

La utilización de la enzima *Msp I* (*Moraxella species*) 5' C/CGG 3' amortiguador basal (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 60 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoetanol y 0.01% BSA), 10 µl de producto amplificado (*CYP2D6**3), amortiguador 10^x T (330 mM Tris-acetato pH7.9, 100 mM Mg-acetato, 5 mM Ditiotretol y 660 mM K-acetato) con albúmina sérica bobina libre (0.1% BSA-libre) y la cantidad suficiente de agua inyectable para completar 15 µl de volumen final, permitieron obtener los fragmentos de restricción específicos para los homocigotos mutados (*³/₃), los homocigotos normales (*^w/_w) y los heterocigotos (*^w/₃) para el alelo *CYP2D6**3 (**tabla 15**).

Por otro lado, la utilización de la enzima *Mva I* (*Micrococcus varians*) 5' CC (A/T) GG 3' amortiguador basal (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 15 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM DTT y 0.01% BSA), 10 µl de producto amplificado (*CYP2D6**4), amortiguador 10^x K (200 mM Tris-HCl pH8.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM Ditiotretol y 1000 mM KCl) y la cantidad suficiente de agua inyectable para completar 20 µl de volumen final, permitieron obtener los fragmentos de restricción específicos para los homocigotos mutados (*⁴/₄), los homocigotos normales (*^w/_w) y los heterocigotos (*^w/₄) para el alelo *CYP2D6**4 (**tabla 15**).

Tabla 15. Mezcla por RFLP para la obtención de los fragmentos de interés en la determinación genotípica de los alelos *3 y *4 del *CYP2D6*

Mezcla	<i>CYP2D6</i> *3	<i>CYP2D6</i> *4
Producto de amplificación *3	10 µl	----
Producto de amplificación *4	----	10 µl
<i>Msp I</i> 2U [^{10U} /µl]	0.1 µl	----
<i>Mva I</i> 1U [^{10U} /µl]	----	0.2 µl
Amortiguador 10 ^x T	1.5 µl	----
Amortiguador 10 ^x K	----	2.0 µl
BSA [0.1 %]	3.0 µl	----
Agua grado inyectable	c.b.p. 15.0 µl	c.b.p. 20.0 µl

En los cuadros 2 y 3 se esquematizan los sitios de corte específicos de las enzimas de restricción empleadas en el estudio sobre las secuencias amplificadas por PCR tanto para el alelo CYP2D6 *3 como para el CYP2D6 *4.

5.6.4 Análisis electroforético de los fragmentos obtenidos de la restricción enzimática

Se analizaron por electroforesis vertical los fragmentos obtenidos de la restricción enzimática de los alelos *3 y *4 del CYP2D6, tanto de pacientes como de controles. Se tomó el volumen total de las RFLPs y se mezclaron con 10 µl de colorante para geles no desnaturizantes, se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% durante 3 hrs. (CYP2D6*3) y al 8% durante 2 hrs. (CYP2D6*4), respectivamente, para cada alelo empleando un marcador de peso molecular (pBR322 DNA -No. V 8-587pb, o en su defecto, uno con escala de 100bp) para su análisis y clasificación genotípica correspondiente. Los geles se corrieron por separado en cámaras de electroforesis en vertical a 270V y 45 mA, con amortiguador TBE 1X, se tiñeron con bromuro de etidio, y se visualizaron con luz ultravioleta (Bernard y col., 200; Maniatis, 1982; Schur y col., 2001).

En la figura 8 se representa un gel de poliacrilamida en el que se esquematizan las bandas características generadas por el corte específico de las enzimas de restricción empleadas en este estudio (*Mva* I, *Msp* I), las cuales, corresponden a los genotipos homocigotos normales (*w/*w), homocigotos mutados (*3/*3 y *4/*4) y heterocigotos (*3/*w y *4/*w) tanto para el alelo CYP2D6 *3 como para el CYP2D6 *4; también se esquematizan las bandas características de los productos amplificados por PCR tanto para el alelo *3 como para el *4 y las bandas correspondientes al marcador de peso molecular empleado en este estudio (pBR322 DNA -No. V 8-587pb).

5.7 Determinación de la frecuencia alélica

La composición genética de los individuos con enfermedad de Parkinson e individuos control analizados en este estudio se describe en términos de frecuencia alélica, la cual se calculó a partir de las siguientes ecuaciones:

p = frecuencia de homocigotos ($^w/w$) + $\frac{1}{2}$ (frecuencia de heterocigotos $^w/$)

q = frecuencia de homocigotos ($^*/$) + $\frac{1}{2}$ (frecuencia de heterocigotos $^w/$)

$q = 1 - p$

donde: p = frecuencia alélica de w

q = frecuencia alélica de $*$

Se realizó la prueba de Xi cuadrada para determinar si existen diferencias entre los fenotipos metabolizadores de individuos sanos e individuos con enfermedad de Parkinson, y una razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para ver si existe evidencia estadísticamente significativa que indique una posible asociación del fenotipo metabolizador lento de CYP2D6 como factor de susceptibilidad en la etiología de la enfermedad de Parkinson tomándose como estadísticamente significativo cuando los IC 95% fueran mayor a uno y cuando la $p < 0.05$.

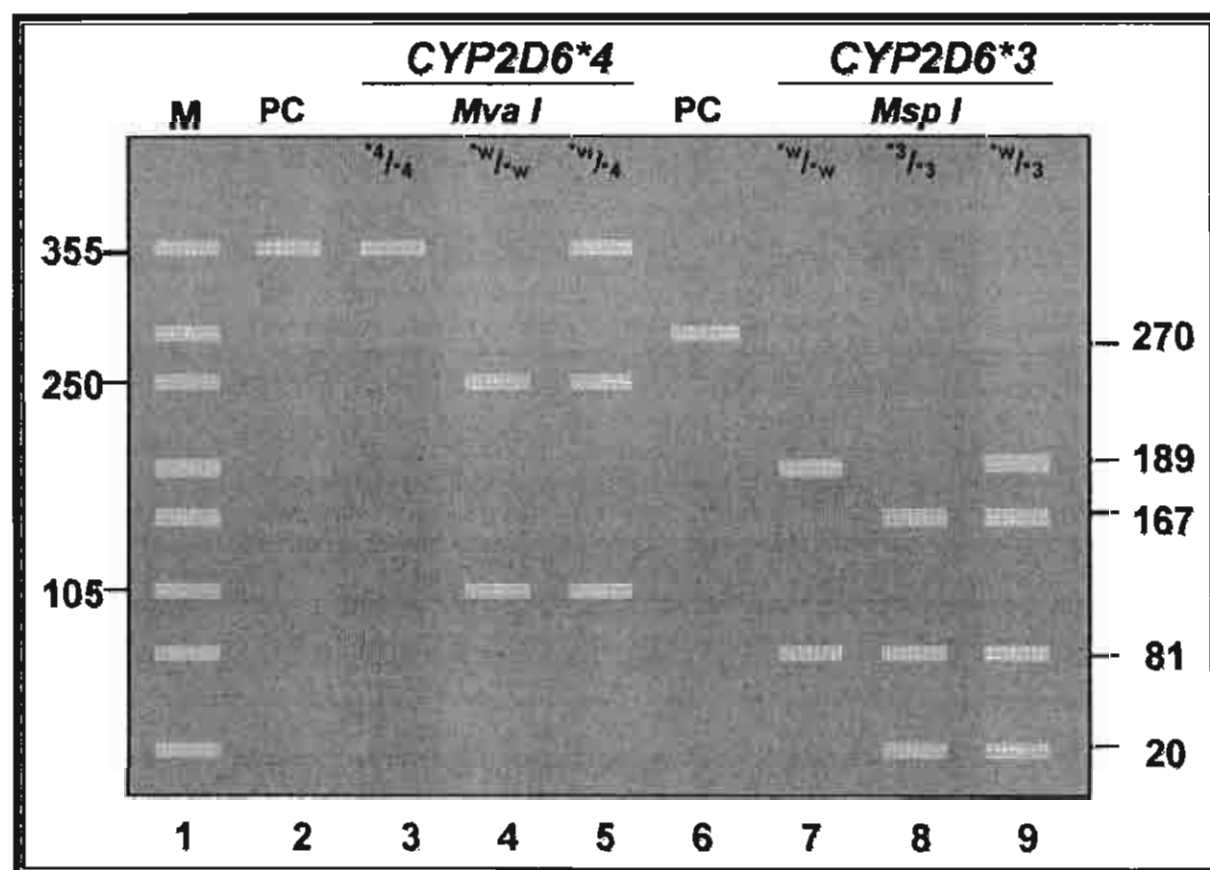


Figura 8 Representación esquemática de un gel de poliacrilamida con las bandas características de un homocigoto normal ($^w/w$ - carriles 4 y 7), un heterocigoto ($^w/$ y $^w/$ - carriles 5 y 9) y un homocigoto mutado ($^3/$ y $^4/$ - carriles 3 y 8) tanto para el alelo CYP2D6*3 como para el alelo CYP2D6*4 respectivamente. En el carril No 1 se observan las bandas del marcador de peso molecular, y en los carriles 2 y 6 las bandas características del producto de DNA amplificado por PCR tanto para el alelo 3 como para el 4 respectivamente.

VI. Resultados

6.1 Tamaño de muestra

En este estudio (casos – control) se creó un banco de DNA genómico de 61 pacientes y 131 controles y se caracterizaron dos alelos diferentes no funcionales del gen *CYP2D6* (*CYP2D6*3* y *CYP2D6*4*) por análisis del mapa de restricción (ver **tablas 16 y 17**).

Tabla 16. Lista de DNA genómico de los 61 pacientes con parkinson pertenecientes a la población mestiza mexicana que conforman el banco de DNA de casos creado en este estudio

Paciente	Edad	DNA [ng/ml]	DNA Pureza	CYP2D6*3	CYP2D6*4
PF01-2002	54	405	2.02	wt/wt	wt/wt
PM02-2002	60	375	2.08	wt/wt	wt/wt
PM03-2002	63	505	2.08	wt/wt	wt/wt
PM04-2002	51	585	1.95	wt/wt	wt/4
PM05-2002	77	700	2.07	wt/wt	wt/wt
PF06-2002	68	445	1.89	wt/wt	wt/4
PM07-2002	77	110	1.57	wt/wt	wt/wt
PM08-2002	60	1065	1.92	wt/wt	wt/wt
PF09-2002	65	645	1.87	wt/wt	wt/wt
PF10-2002	60	290	2.07	wt/wt	wt/4
PF11-2002	70	1435	2.02	wt/wt	wt/wt
PM12-2002	55	1180	2	wt/wt	wt/4
PM13-2002	70	480	2	wt/wt	wt/wt
PF14-2002	56	495	2.06	wt/wt	wt/wt
PF15-2002	77	800	2	wt/wt	wt/wt
PM16-2002	70	600	2.03	wt/wt	wt/4
PF17-2002	65	835	2.04	wt/wt	wt/wt
PM18-2002	50	525	2.1	wt/wt	wt/4
PM19-2002	62	365	1.87	wt/wt	wt/wt
PM20-2002	50	615	1.95	wt/wt	wt/wt
PM21-2002	53	295	2.03	wt/wt	wt/wt
PF22-2002	73	130	1.86	wt/wt	wt/wt
PM23-2002	66	505	2.1	wt/wt	wt/wt
PM24-2002	57	365	2.09	wt/wt	wt/4
PM25-2002	68	340	2.19	wt/wt	wt/wt
PM26-2002	66	425	2.12	wt/wt	wt/wt
PM27-2002	76	195	2.17	wt/wt	wt/wt
PF28-2002	55	455	2.17	wt/wt	wt/wt
PF29-2002	64	365	2.21	wt/wt	wt/4
PF30-2002	56	125	2.08	wt/wt	wt/wt
PF31-2002	51	50	2	wt/wt	wt/wt
PM32-2002	71	135	3	wt/wt	wt/wt
PF33-2002	76	405	1.8	wt/wt	wt/wt
PM34-2002	65	470	1.77	wt/wt	wt/wt
PM35-2002	61	235	2.14	wt/wt	wt/wt
PM36-2002	51	370	1.95	wt/wt	wt/wt
PM37-2002	67	185	1.95	wt/wt	wt/wt
PM38-2002	64	185	2.47	wt/wt	wt/wt
PM39-2002	59	155	1.63	wt/wt	wt/4
PM40-2002	64	210	1.54	wt/wt	wt/4
PF41-2002	84	320	1.73	wt/wt	wt/wt
PF42-2002	52	465	2.066	wt/wt	wt/4
PM43-2002	69	955	2.053	wt/wt	wt/wt
PM44-2002	50	755	1.961	wt/wt	wt/wt
PM45-2002	51	325	1.71	wt/wt	wt/wt

■ Homocigotos normales ($^{wt}/^{wt}$) ■ Heterocigotos para el *3 ($^{wt}/^{*3}$)
 ■ Homocigotos mutado ($^{*4}/^{*4}$) ■ Heterocigotos para el *4 ($^{wt}/^{*4}$)

Tabla 16. Continuación ...

Paciente	Edad	DNA (ng/ml)	DNA Pureza	CYP2D6*3	CYP2D6*4
PF46-2002	55	200	1.83	w/w	w/w
PM47-2002	60	110	1.83	w/w	4/4
PF48-2002	50	215	1.95	w/w	w/w
PM49-2002	50	125	1.71	w/w	w/w
PM50-2002	52	990	1.86	w/w	w/w
PF51-2002	53	70	1.5	w/w	14/14
PM52-2002	65	50	2.2	w/w	w/w
PF53-2002	50	80	2.3	w/w	4/4
PF54-2002	51	50	2.2	w/w	w/w
PM55-2002	90	70	2.1	w/w	4/4
PM56-2003	53	363	1.8	w/w	w/w
PF57-2003	74	70	2	w/w	4/4
PM58-2003	73	80	1.8	w/w	w/w
PM59-2003	61	87	1.8	w/w	w/w
PM60-2003	53	110	1.8	w/w	w/w
PM61-2003	78	90	1.8	w/w	w/w

■ Homocigotos normales ($^{*W}/^{*W}$) ■ Heterocigotos para el *3 ($^{*W}/^{*3}$)
 ■ Homocigotos mutado ($^{*3}/^{*3}$) ■ Heterocigotos para el *4 ($^{*W}/^{*4}$)

Tabla 17. Lista de DNA genómico de los 131 controles pertenecientes a la población mestiza mexicana mayores de 49 años y sin rastro de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa que conforman el banco de DNA creado en este estudio

Control	Edad	DNA (ng/ml)	DNA Pureza	CYP2D6*3	CYP2D6*4
CPM01-2002	64	450	2.25	w/w	w/w
CPF02-2002	69	735	1.73	w/w	4/4
CPF03-2002	74	975	2.10	w/w	w/w
CPF04-2002	74	1040	2.01	w/w	4/4
CPF05-2002	65	725	1.92	w/w	w/w
CPM06-2002	84	1185	1.87	w/w	w/w
CPF07-2002	72	690	1.72	w/w	4/4
CPF08-2002	69	870	1.65	w/w	w/w
CPF09-2002	74	835	1.74	w/w	w/w
CPF10-2002	79	580	1.91	w/w	w/w
CPF11-2002	86	290	1.85	w/w	4/4
CPF12-2002	74	1005	1.89	w/w	w/w
CPM13-2002	81	770	2.40	w/w	w/w
CPF14-2002	55	330	1.67	w/w	4/4
CPF15-2002	59	700	1.70	w/w	w/w
CPF16-2002	63	925	2.09	w/w	w/w
CPF17-2002	68	950	1.91	w/w	w/w
CPF18-2002	60	580	1.80	w/w	w/w
CPF19-2002	63	310	1.99	w/w	w/w
CPF20-2002	68	380	1.63	w/w	w/w
CPF21-2002	57	375	1.79	w/w	w/w
CPF22-2002	55	455	1.81	w/w	w/w
CPF23-2002	78	785	1.70	w/w	w/w
CPF24-2002	53	290	1.85	w/w	w/w
CPF25-2002	53	540	1.86	w/w	w/w
CPF26-2002	71	615	1.93	w/w	4/4
CPF27-2002	64	395	1.91	w/w	w/w
CPF28-2002	57	340	2.1	w/w	w/w
CPM29-2002	69	385	1.99	w/w	4/4
CPF30-2002	76	430	1.81	w/w	4/4
CPM31-2002	74	275	1.92	w/w	4/4
CPF32-2002	53	200	1.97	w/w	w/w

■ Homocigotos normales ($^{*W}/^{*W}$) ■ Heterocigotos para el *3 ($^{*W}/^{*3}$)
 ■ Homocigotos mutado ($^{*3}/^{*3}$) ■ Heterocigotos para el *4 ($^{*W}/^{*4}$)

Tabla 17. Continuación ...

Control	Edad	DNA (ng/ml)	DNA Pureza	CYP2D6*3	CYP2D6*4
CPF33-2002	77	795	2.3	wt/wt	wt/wt
CPF34-2002	77	780	1.99	wt/wt	wt/wt
CPF35-2002	77	504	1.89	wt/wt	wt/wt
CPF36-2002	81	632	2.5	wt/wt	wt/wt
CPF37-2002	78	398	1.85	wt/wt	wt/wt
CPM38-2002	90	569	1.78	wt/wt	wt/wt
CPF39-2002	64	239	1.65	wt/wt	wt/wt
CPF40-2002	79	365	2.0	wt/wt	wt/wt
CPF41-2002	77	347	1.89	wt/wt	wt/wt
CPF42-2002	77	450	1.97	wt/wt	wt/wt
CPF43-2002	68	435	1.93	wt/wt	wt/wt
CPF44-2002	60	585	1.95	wt/wt	wt/wt
CPF45-2002	80	305	1.98	wt/wt	wt/wt
CPF46-2002	75	669	2.0	wt/wt	wt/wt
CPF47-2002	87	515	1.89	wt/wt	wt/wt
CPF48-2002	82	495	1.96	wt/wt	wt/wt
CPF49-2002	82	318	2.04	wt/wt	wt/wt
CPF50-2002	74	579	1.93	wt/wt	wt/wt
CPF51-2002	58	560	2.3	wt/wt	wt/wt
CPF52-2002	58	420	1.79	wt/wt	wt/wt
CPF53-2002	82	357	1.99	wt/wt	wt/wt
CPF54-2002	88	356	2.00	wt/wt	wt/wt
CPF55-2002	83	558	1.92	wt/wt	wt/wt
CPF56-2002	78	224	2.10	wt/wt	wt/wt
CPF57-2002	76	704	1.95	wt/wt	wt/wt
CPF58-2002	82	480	1.93	wt/wt	wt/wt
CPF59-2002	83	189	1.96	wt/wt	wt/wt
CPF60-2002	83	379	1.91	wt/wt	wt/wt
CPF61-2002	77	338	1.97	wt/wt	wt/wt
CPF62-2002	70	648	1.90	wt/wt	wt/wt
CPF63-2002	69	561	1.87	wt/wt	wt/wt
CPF64-2002	65	483	1.92	wt/wt	wt/wt
CPF65-2002	82	139	1.95	wt/wt	wt/wt
CPF66-2002	58	528	1.87	wt/wt	wt/wt
CPF67-2002	75	789	1.95	wt/wt	wt/wt
CPF68-2002	83	967	1.82	wt/wt	wt/wt
CPF69-2002	59	407	1.86	wt/wt	wt/wt
CPF70-2002	81	881	1.92	wt/wt	wt/wt
CPF71-2002	68	594	1.96	wt/wt	wt/wt
CPF72-2002	69	756	1.90	wt/wt	wt/wt
CPF73-2002	73	612	1.94	wt/wt	wt/wt
CPF74-2002	76	939	1.91	wt/wt	wt/wt
CPF75-2002	55	693	1.85	wt/wt	wt/wt
CPF76-2002	75	545	1.97	wt/wt	wt/wt
CPF77-2002	70	525	1.80	wt/wt	wt/wt
CPM78-2002	82	625	1.92	wt/wt	wt/wt
CPM79-2002	72	285	2.0	wt/wt	wt/wt
CPM80-2002	69	530	2.2	wt/wt	wt/wt
CPM81-2002	80	490	1.75	wt/wt	wt/wt
CPM82-2002	72	1105	1.70	wt/wt	wt/wt
CPM83-2002	73	545	1.84	wt/wt	wt/wt
CPM84-2002	81	256	1.95	wt/wt	wt/wt
CPM85-2002	77	345	1.80	wt/wt	wt/wt
CPM86-2002	93	455	1.93	wt/wt	wt/wt
CPM87-2002	71	320	1.98	wt/wt	wt/wt
CPM88-2002	94	470	1.93	wt/wt	wt/wt
CPM89-2002	72	240	1.89	wt/wt	wt/wt
CPM90-2002	87	250	1.95	wt/wt	wt/wt
CPM91-2002	83	755	1.97	wt/wt	wt/wt
CPM92-2002	86	295	1.91	wt/wt	wt/wt
CPM93-2002	81	795	2.3	wt/wt	wt/wt
CPM94-2002	63	500	1.90	wt/wt	wt/wt

■ Homocigotos normales ($^{*W}/^{*W}$) ■ Heterocigotos para el *3 ($^{*W}/^{*3}$)
 ■ Homocigotos mutado ($^{*3}/^{*3}$) ■ Heterocigotos para el *4 ($^{*W}/^{*4}$)

Tabla 17. Continuación ...

Control	Edad	DNA (ng/ml)	DNA Pureza	CYP2D6*3	CYP2D6*4
CPM95-2002	78	445	1.83	w/w	w/w
CPM96-2002	77	270	1.93	w/w	w/w
CPF97-2002	82	706	1.80	w/w	w/w
CPM98-2002	80	425	1.97	w/w	w/w
CPF99-2002	68	520	1.94	w/w	w/w
CPM100-2002	69	495	1.96	w/w	w/w
CPF101-2002	71	330	1.80	w/w	w/w
CPF102-2002	73	245	1.83	w/w	w/w
CPM103-2002	57	615	1.69	w/w	w/w
CPF104-2002	77	714	2.0	w/w	w/w
CPM105-2002	65	521	1.94	w/w	w/w
CPM106-2002	54	632	1.91	w/w	w/w
CPM107-2002	52	344	2.5	w/w	w/w
CPF108-2002	53	525	1.97	w/w	w/w
CPM109-2002	68	311	1.92	w/w	w/w
CPM110-2002	53	401	1.95	w/w	w/w
CPM111-2002	60	292	1.93	w/w	w/w
CPF112-2002	65	780	1.88	w/w	w/w
CPF113-2002	61	813	1.87	w/w	w/w
CPF114-2002	70	214	1.97	w/w	w/w
CPM115-2002	53	915	1.85	w/w	w/w
CPF116-2002	77	718	1.82	w/w	w/w
CPM117-2002	65	624	1.80	w/w	w/w
CPM118-2002	51	531	2.0	w/w	w/w
CPF119-2002	56	352	1.84	w/w	w/w
CPM120-2002	60	483	1.95	w/w	w/w
CPF121-2002	52	761	1.82	w/w	w/w
CPF122-2002	67	629	1.91	w/w	w/w
CPF123-2002	65	314	1.94	w/w	w/w
CPM124-2002	57	349	1.88	w/w	w/w
CPM125-2002	52	242	1.75	w/w	w/w
CPM126-2002	54	627	1.71	w/w	w/w
CPM127-2002	56	447	2.0	w/w	w/w
CPM128-2002	52	514	1.99	w/w	w/w
CPF129-2002	51	1470	1.79	w/w	w/w
CPF130-2002	57	1740	1.75	w/w	w/w
CPF131-2002	53	105	1.82	w/w	w/w

■ Homocigotos normales ($^{w/w}$) ■ Heterocigotos para el *3 ($^{w/3}$)
 ■ Homocigotos mutado ($^{3/3}$) ■ Heterocigotos para el *4 ($^{w/4}$)

6.2 Extracción del DNA genómico

El DNA genómico se extrajo según los procedimientos antes señalados. No se eligió solo un método de extracción de DNA genómico debido a que los dos métodos utilizados en esta técnica nos dieron una buena pureza y un buen rendimiento de DNA genómico; cabe mencionar que el método más rápido (aproximadamente 1½ hrs.) y que brinda una mayor pureza de DNA genómico es el método en columna del Kit de QIAGEN® por columna, aunque la concentración de DNA genómico no era la suficiente como para crear un banco de DNA, por lo que se tuvieron que intercalar los dos protocolos de extracción de DNA genómico descritos en este trabajo (método de sales-fenol-cloroformo y el método por columna de QIAGEN®) para la creación del banco de DNA genómico

tanto de pacientes con enfermedad de Parkinson como de controles mayores de 50 años, así como para la genotipificación de los alelos *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4* estudiados en este trabajo.

6.3 Análisis espectrofotométrico y electroforético del DNA genómico

Debido a que el objetivo de este trabajo no fue el buscar el método de extracción de DNA genómico más eficiente, no se comparan los rendimientos y las purezas de los DNA genómicos extraídos por los dos métodos antes mencionados. En las **tablas 16** y **17** se muestran las concentraciones de los DNA genómicos extraídos, así como las purezas de los mismos; el promedio de las concentraciones de DNA genómico extraído fue de $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ y el de las purezas fue de 1.94 juntando las muestras de controles como de pacientes que suman un total de 192 muestras de DNA genómico.

En la **figura 9** se muestra un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta, en el cual, se puede observar la integridad del DNA genómico extraído por las técnicas ya mencionadas.

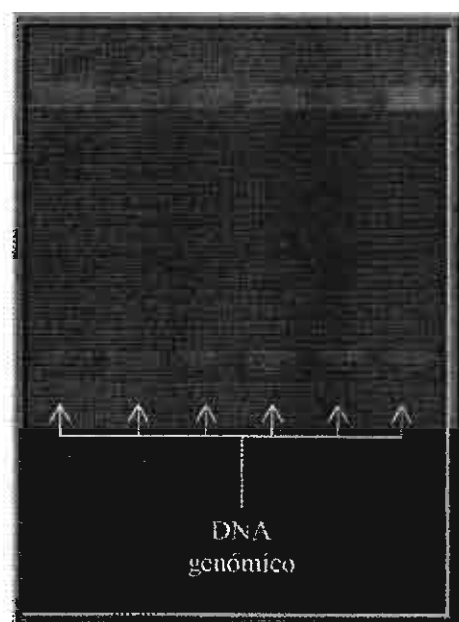


Figura 9.
Foto representativa de 192 muestras de DNA genómico analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñidas con bromuro de etidio y visualizadas con luz ultravioleta.

6.4 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los productos de la reacción de PCR de los alelos *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4* del *CYP2D6* tanto de pacientes como de controles se analizaron por electroforesis en cama horizontal en geles de agarosa al 3 % empleando un marcador de peso molecular (pBR322 DNA – No. V 8 – 587pb), y se visualizaron con luz ultravioleta. En la **figura 10** se observa un gel de agarosa al 3% en el que se representa el producto amplificado para el alelo *CYP2D6*3* (270 pb) y el producto amplificado para el alelo *CYP2D6*4* (355 pb) de las 192 muestras estudiadas.

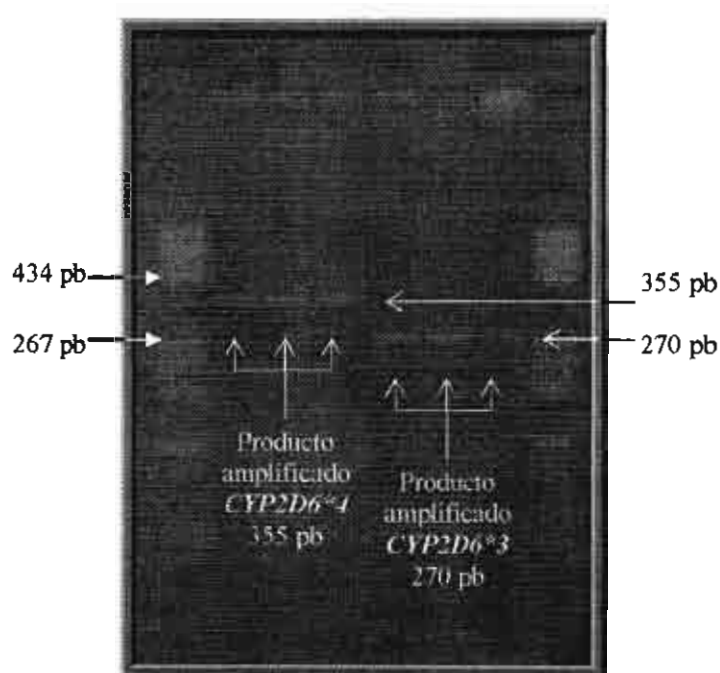


Figura 10.

Foto representativa de 192 muestras amplificadas por PCR para el alelo *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4* analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizadas con luz ultravioleta.

6.5 RFLP (Restricción enzimática)

En la **figura 11** se presenta un gel de poliacrilamida al 15 % el cual se trató con bromuro de etidio y fue resuelto con luz UV, en él, se pueden observar los 2 genotipos encontrados para el polimorfismo *CYP2D6*3* tanto en las muestras de pacientes como en las muestras de controles analizadas en este estudio. En el carril número 1, se muestra el marcador de peso molecular (pBR322 DNA – No. V 8 – 587 pb), en el carril 3 se observan las 4 bandas características (189, 167, 81 y 20 pb) correspondientes a un genotipo heterocigoto ($^{*W}/_{*3}$) con fenotipo metabolizador extenso, y en el

carril número 5, se muestra un genotipo homocigoto normal ($^{*W}/^{*W}$) con fenotipo metabolizador extenso el cual presenta dos bandas características (189 y 81 pb) producto de la restricción de fragmentos de longitud variable (RFLP) que se hizo a cada producto amplificado por PCR (carril 2 y 4) con la enzima de restricción *Msp I*; tómese en cuenta que las 2 bandas que se distinguen casi al final del gel en los carriles 2, 3, 4, y 5, son correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la restricción de los amplificados de la PCR, excepto la franja de 20 pb del carril 3, distíngase la tonalidad de la misma con respecto a la de los demás carriles, lo cual indica ser la banda de 20 pb correspondiente al genotipo heterocigoto que se sobrelapa con la banda de un oligonucleótido.

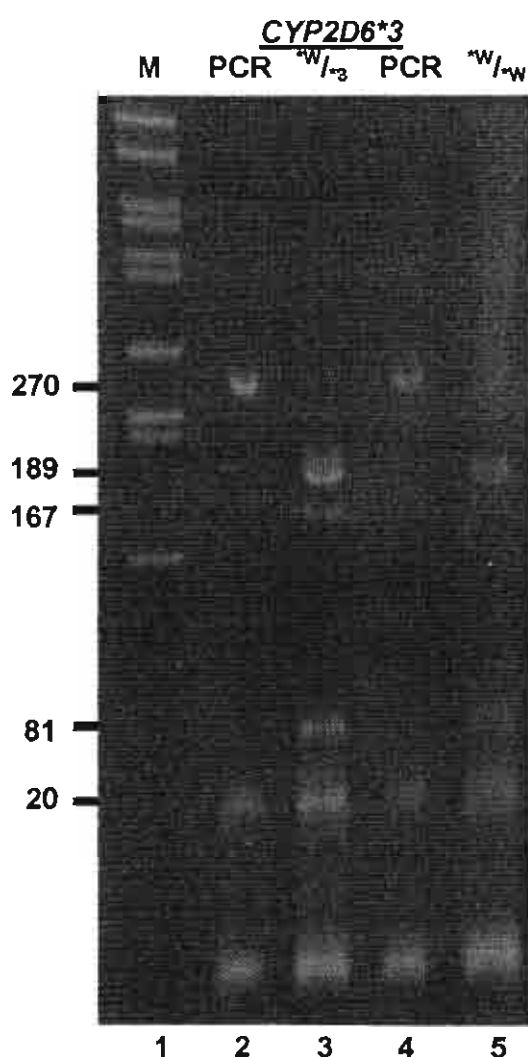
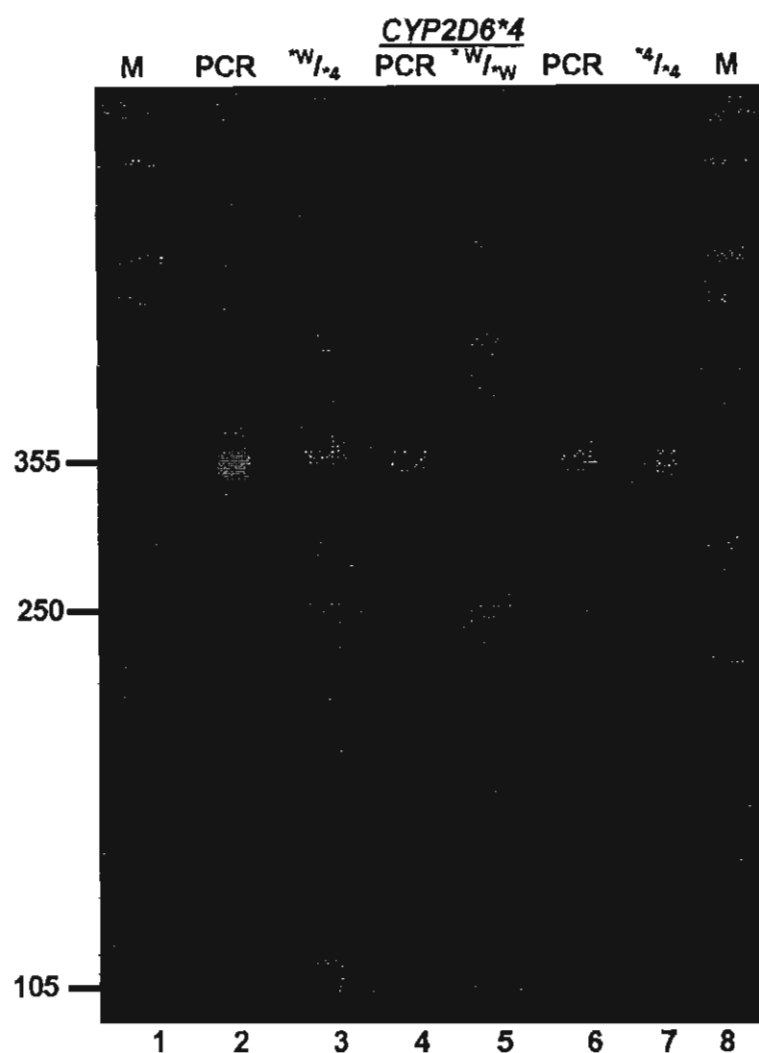


Figura 11. Gel de poliacrilamida al 15% para identificar los genotipos del alelo *CYP2D6*3*. Carril 1, marcador de peso molecular (pBR322 DNA); carril 2, producto de amplificación por PCR; carril 3, heterocigoto ($^{*W}/^{-3}$) – producto de la restricción con la enzima *Msp I* de la muestra del carril 2; carril 4, producto de amplificación por PCR; carril 5, homocigoto ($^{*W}/^{*W}$) – producto de la restricción con la enzima *Msp I* de la muestra del carril 4. Las 2 bandas que se distinguen abajo del gel en los carriles 2, 3, 4 y 5, son las correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la restricción de los amplificados de la PCR, excepto la banda de 20 pb del carril 3, distíngase la tonalidad de la misma con respecto a la de los demás carriles, lo cual indica ser la banda de 20 pb correspondiente al genotipo heterocigoto que se sobrelapa con la banda de un oligonucleótido.

En la **figura 12** se presenta un gel de poliacrilamida al 8 % el cual se trató con bromuro de etidio y fue resuelto con luz U.V., en él, se pueden observar los genotipos encontrados para el polimorfismo *CYP2D6*4* en las 61 muestras de pacientes y en las 131 muestras control analizadas hasta este momento. En los carriles número 1 y 8, se muestra el marcador de peso molecular (pBR322 DNA – No. V 8 – 587 pb), en el carril 3 se observan las 3 bandas características (355, 250, y 105 pb) correspondientes a un genotipo heterocigoto ($^{*w}/_{*4}$) con fenotipo metabolizador extenso, en el carril número 5, se muestra un genotipo homocigoto normal ($^{*w}/_{*w}$) con fenotipo metabolizador extenso el cual presenta dos bandas características (250 y 105 pb), y en el carril 7, se observa la banda característica de un genotipo homocigoto mutado ($^{*4}/_{*4}$) con fenotipo metabolizador lento producto de la restricción de fragmentos de longitud variable (RFLP) que se realizó a cada producto amplificado por PCR (carril 2, 4 y 6) con la enzima de restricción *Mva I*. Cabe mencionar que el genotipo homocigoto mutado ($^{*4}/_{*4}$) solo se encontró en uno de los 61 pacientes estudiados en este trabajo, no obstante, no se encontró ningún homocigoto mutado en los 131 controles estudiados en este trabajo.

6.6 Frecuencias alélicas

Se analizaron 61 muestras de pacientes con enfermedad de Parkinson, de los cuales, como se puede ver en la **tabla 18**, se obtuvo un 73% de pacientes con genotipo homocigoto normal ($^{*w}/_{*w}$), lo cual indica que presentan el fenotipo metabolizador extenso o rápido; 2% de pacientes con genotipo heterocigoto para el polimorfismo *CYP2D6*3* ($^{*w}/_{*3}$), indicando que presentan el fenotipo metabolizador extenso; un 23% de pacientes con genotipo heterocigoto para el polimorfismo *CYP2D6*4* ($^{*w}/_{*4}$), indicando que presentan el fenotipo metabolizador extenso. De las 61 muestras de DNA pertenecientes a los pacientes con enfermedad de Parkinson, no se encontró ninguno que presente el genotipo heterocigoto compuesto ($^{*3}/_{*4}$) que indicaría un fenotipo metabolizador pobre o lento; de la misma forma, tampoco se encontró algún paciente con genotipo homocigoto mutado para el alelo 3 ($^{*3}/_{*3}$), y solamente un paciente de los 61 analizados (2%) presento el genotipo homocigoto mutado para el alelo **4* ($^{*4}/_{*4}$) que corresponde a un fenotipo metabolizador lento.



Respecto al grupo control, se analizaron 131 muestras de voluntarios mayores de 49 años sin indicios de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa, de los cuales, se muestra la frecuencia genotípica en la **tabla 18**; como se puede ver, se ha obtenido un 76% de voluntarios con genotipo homocigoto normal ($^{*w}/_{*w}$), lo cual indica que presentan el fenotipo metabolizador extenso o rápido; 2% de voluntarios con genotipo heterocigoto para el polimorfismo *CYP2D6*3* ($^{*w}/_{*3}$), indicando que presentan el fenotipo metabolizador extenso; y un 22% de voluntarios con genotipo heterocigoto para el polimorfismo *CYP2D6*4* ($^{*w}/_{*4}$), indicando que presentan el fenotipo metabolizador extenso. De las 131 muestras de DNA pertenecientes a los voluntarios mayores de 49 años, no se encontró ninguno que presente el genotipo heterocigoto compuesto ($^{*3}/_{*4}$) que indicaría un fenotipo metabolizador pobre o lento; de la misma forma, tampoco se encontró algún paciente con genotipo

homocigoto mutado ni para el alelo *3 (*³/_{*3}), ni para el alelo *4 (*⁴/_{*4}) los cuales presentarían el fenotipo metabolizador pobre.

Tabla 18. Frecuencias genotípicas de la población mexicana con enfermedad de Parkinson y de voluntarios sin enfermedades neurodegenerativas

Fenotipos metabolizadores	Genotipo <i>CYP2D6</i>	Pacientes con enfermedad de Parkinson			Controles sin enfermedades neurodegenerativas		
		Total (n = 61)	Frecuencia	%	Total (n = 131)	Frecuencia	%
Extensos ME	Homocigotos normales *W/*W	45	0.73	73	100	0.76	76
Extensos ME	Heterocigotos *W/*3	1	0.02	2	2	0.02	2
Lentos MP	Homocigotos mutados *3/*3	0	0.00	0	0	0.00	0
Extensos ME	Heterocigotos *W/*4	14	0.23	23	29	0.22	22
Lentos MP	Homocigotos mutados *4/*4	1	0.02	2	0	0.00	0

En la **tabla 19** se muestran las frecuencias alélicas encontradas en el grupo de pacientes y de controles estudiados en este trabajo; el alelo *1 (*W), se refiere al alelo funcional tipo silvestre del *CYP2D6*, el cual se presentó en un 87% en pacientes con parkinson y en un 88% en el grupo control; el alelo no funcional *3, se refiere a la presencia de la mutación *A*₂₆₃₇ en el exón 5 del *CYP2D6*, el cual se presentó en un 1% tanto en pacientes con parkinson como en el grupo control; y el alelo no funcional *4, se refiere a la presencia de la mutación *G*_{1934A} en el intrón 3 – unido al exón 4, el cual se presentó en un 12% en pacientes con enfermedad de parkinson y en un 11% en el grupo control analizado.

Tabla 19. Frecuencias alélicas de la población mexicana con enfermedad de Parkinson y de voluntarios sin enfermedades neurodegenerativas

Alelos <i>CYP2D6</i>	Pacientes con enfermedad de Parkinson			Controles sin enfermedades neurodegenerativas		
	n = 61 x 2	Frecuencia	%	n = 131 x 2	Frecuencia	%
*1	106	0.87	87	231	0.88	88
*3	1	0.01	1	2	0.01	1
*4	15	0.12	12	29	0.11	11

Se aplico una prueba de hipótesis para dos muestras independientes a las frecuencias genotípicas encontradas tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control; realizándose una prueba de Xi cuadrada y calculándose la razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95% (IC 95%). En la **tabla 20**, se muestran los datos obtenidos.

Tabla 20. Análisis estadístico de *CYP2D6* en pacientes y controles

Secuencia <i>CYP2D6</i>		Casos n = 61 (%)	Controles n = 131 (%)	RM (95%, IC)	Valor de p
CYP 2D6*3	*Mutación <i>A</i> ₂₆₃₇	1 (1.64)	2 (1.53)	1.075 (0.096 - 12.08)	p > 0.05
	Homocigotos (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	-----	-----
	Heterocigotos (%)	1 (1.64)	2 (1.53)	1.075 (0.096 - 12.08)	p > 0.05
CYP 2D6*4	*Mutación <i>G</i> ₁₉₃₄ <i>A</i>	15 (24.60)	29 (22.14)	1.147 (0.562 - 2.342)	p > 0.05
	Homocigotos (%)	1 (1.64)	0 (0.0)	-----	-----
	Heterocigotos (%)	14 (22.95)	29 (22.14)	1.048 (0.507 - 2.164)	p > 0.05
Secuencia normal (%)		45 (73.77)	100 (76.33)	0.872 (0.434 - 1.753)	p > 0.05

*Mutación = Homocigotos + Heterocigotos

RM = Razón de momios; IC = intervalos de confianza

VII. Discusión de Resultados

7. Discusión de resultados

Barbeau y colaboradores en el año de 1985 plantearon la hipótesis que sugiere que los metabolizadores pobres de CYP2D6 tienen un incremento de susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de Parkinson debido al daño neuronal causado por la destoxificación lenta de neurotoxinas, de acuerdo a su estudio farmacocinético que media la actividad enzimática de la CYP2D6. Hasta el momento se han descrito muchas variaciones genéticas en el sistema *CYP2D6*, ya que se han identificado más de 70 alelos diferentes, siendo el polimorfismo *B* la mutación mas común (*CYP2D6*4*) que involucra una sustitución de una base de G por una A en el nucleótido 1934 y que presenta una frecuencia alélica del 21.5 al 28.6% en población caucásica. La segunda mutación más común es el polimorfismo *A* (*CYP2D6*3*) que tiene una frecuencia alélica del 2.7% en población caucásica e involucra una delección de la *A*₂₆₃₇ en el exón 5. Todas las demás mutaciones identificadas son raras y constituyen menos del 1% de todas las variaciones alélicas del *CYP2D6* (Schur y col., 2001). Estas mutaciones causan una actividad baja de la enzima CYP2D6 la cual está involucrada en el metabolismo oxidativo de más del 25% de los fármacos que actualmente se utilizan en la práctica clínica, así como de diversas neurotoxinas ambientales como el MPTP la cual causa síndromes parkinsonianos irreversibles en humanos y monos debido a la destrucción de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro, que es el centro de control motriz.

Existen reportes de estudios a nivel molecular sobre la asociación del fenotipo metabolizador pobre o lento y el genotipo de la CYP2D6 con la etiología de la enfermedad de Parkinson, como es el caso del reportado por *Armstrong* y colaboradores (1992) en población inglesa (*CYP2D6 *4*; razón de momios 2.7, IC 95%: 1.14–6.41) y el reportado por *McCann* y colaboradores (1997) en población australiana (*CYP2D6 *4*; razón de momios 1.7, IC 95%: 0.94–2.45). Sin embargo, también existen trabajos que no apoyan esta hipótesis, como es el caso de los estudios hechos en población alemana por Gasser y colaboradores (1996); en población china en el año de 1998 por Chan y colaboradores; y más recientemente en población española (Navarra) por Guerrero y colaboradores (2002), por citar algunos trabajos. Algunos autores lo explican diciendo que en poblaciones en las cuales se ha encontrado una alta frecuencia de metabolizadores pobres, si se puede hacer la correlación entre el

genotipo homocigoto mutado y el fenotipo PM con la etiología de la enfermedad de Parkinson, y en poblaciones donde la frecuencia es pequeña, esta correlación no tendría razón.

En este estudio se caracterizaron dos formas alélicas no funcionales diferentes del gen *CYP2D6* (*CYP2D6*3* y *CYP2D6*4*) por análisis del mapa de restricción en un grupo formado por 61 pacientes con EP y 131 controles (tabla 21). Todos los individuos pertenecen a la población mestiza mexicana de al menos dos generaciones. No se tomó en cuenta el sexo tanto en pacientes como en controles, ya que es irrelevante para el análisis genotípico. El alelo no funcional *CYP2D6*3*, estuvo presente en 1% tanto en el grupo control como en el de pacientes (tabla 19). El genotipo homocigoto mutado $^{*3}/_{*3}$ no se presentó ni en el grupo de pacientes ni en el control; sin embargo, el genotipo heterocigoto $^{*w}/_{*3}$ se presentó en una frecuencia del 2% tanto en el grupo control como en el de pacientes (tabla 18).

Tabla 21. Características de la población mestiza mexicana analizada en este trabajo

Características	Casos (n = 61)	Controles (n = 131)
Sexo		
- Masculino	39	43
- Femenino	22	88
Edad (años)		
- Media (SD)	62.90 (±10.67)	70.15 (±10.80)
- Rango de edad	50 – 90	51 - 94

El alelo no funcional *CYP2D6*4*, estuvo presente en un 11% en el grupo control *versus* 12% en el grupo de pacientes con EP (tabla 19). El genotipo homocigoto mutado $^{*4}/_{*4}$ solo se presentó en el grupo de pacientes con una frecuencia del 2%; sin embargo, el genotipo heterocigoto $^{*w}/_{*4}$ se presentó en una frecuencia del 22% en el grupo control *versus* 23% en el grupo de pacientes (tabla 18).

El alelo funcional *CYP2D6*1* fue el más común tanto en el grupo control como en el de pacientes, presentándose con una frecuencia del 88% en el grupo control *versus* 87% en el grupo de pacientes (tabla 19). El genotipo homocigoto normal $^{*w}/_{*w}$ se presentó con una frecuencia del 76% en el grupo control *versus* 73% en el grupo de pacientes (tabla 18).

No obstante, al hacer la correlación de fenotipos, se observa que el 100% de la población control *versus* el 98% de los pacientes estudiados en este trabajo presentan el fenotipo metabolizador extenso (ver **tabla 18**), indicando que presentan una actividad enzimática (CYP2D6) normal. En concordancia con estudios previos (Armstrong y col., 1992; McCann y col., 1997), no se halló ninguna evidencia estadísticamente significativa de que la presencia de mutaciones en el gen *CYP2D6* se relacione con una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedad de Parkinson esporádica en población mestiza mexicana.

La presencia del alelo *CYP2D6**4 (24.60% en el grupo de pacientes *versus* 22.14% en el grupo control: razón de momios 1.147, IC 95% 0.562-2.342) y la presencia del alelo *CYP2D6**3 (1.64% en el grupo de pacientes *versus* 1.53% en el grupo control: razón de momios 1.075, IC 95% 0.096-12.08) nos indican que no existe evidencia estadísticamente significativa para decir que existe una asociación de los genotipos mutados del tipo *CYP2D6* (*CYP2D6**3 y *CYP2D6**4) estudiados en este trabajo con la etiología de la enfermedad de Parkinson, ya que no existe diferencia ($p > 0.05$) entre el fenotipo metabolizador pobre encontrado en el grupo de pacientes con respecto al hallado en el grupo control (ver **tabla 20**).

Al comparar la razón de momios encontrada en la población mexicana estudiada con la encontrada en trabajos que sí encuentran asociación, podemos corroborar lo antes señalado (ver **tabla 22**). Aún cuando se aumentó proporcionalmente el tamaño de muestra en la razón de momios aplicada a los datos antes mencionados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, no es necesario aumentar el tamaño de muestra ni de pacientes ni de controles, ya que la frecuencia encontrada del genotipo mutado tanto del alelo *3 como del *4 son demasiado pequeñas.

Tabla 22. Comparación de la razón de momios encontrada en población mexicana con la reportada en otras poblaciones

Secuencia <i>CYP2D6</i>		Casos n	Controles n	RM (95%, IC)
Mexicanos	<i>CYP2D6</i> *4 ($^{*4}/^{*4}$)	61	131	1.147 (0.562 - 2.342)
Ingleses	<i>CYP2D6</i> *4 ($^{*4}/^{*4}$)	53	72	2.7 (1.14 - 6.41)
Australianos	<i>CYP2D6</i> *4 ($^{*4}/^{*4}$)	112	206	1.7 (0.94 - 2.45)

RM = Razón de momios; IC = intervalos de confianza
Armstrong, 1992; McCann, 1997.

En la **tabla 23**, se muestra la frecuencia alélica hallada en la población mexicana analizada, la cual podemos ver que estadísticamente es igual la encontrada en el grupo de pacientes con la hallada en el grupo control; comparándola con la reportada en otras poblaciones en las cuales tampoco encuentran asociación del genotipo mutado de *CYP2D6* (*3 y *4) con la enfermedad de Parkinson, podemos observar que la frecuencia del alelo funcional *CYP2D6**1 y del alelo no funcional *CYP2D6**4 son similares a la encontradas en la población española y la alemana, en contraste, a la reportada del 1% en población china (Chan, 1998). Respecto a la frecuencia del alelo no funcional *CYP2D6**3, este alelo no se encuentra presente ni en la población española, alemana, ni china, estudiadas por Chan, 1998; Guerrero, 2002; Gasser, 1996, y sus colaboradores respectivamente. En la población mexicana analizada en este trabajo se encontró en una frecuencia del 1% del alelo no funcional *CYP2D6**3.

Tabla 23. Comparación de la frecuencia alélica encontrada en población mexicana con la reportada en otras poblaciones en las que no encontraron asociación con la EP

Población	Asociación	Casos (n)	Controles (n)	Frecuencia alélica					
				Casos			Controles		
				*1	*3	*4	*1	*3	*4
Españoles	No	46	54	0.84	0.00	0.16	0.75	0.00	0.25
Chinos	No	215	313	0.99	0.00	0.01	0.99	0.00	0.01
Alemanes	No	115	73	0.79	0.00	0.21	0.80	0.00	0.20
Mexicanos	No	61	131	0.87	0.01	0.12	0.88	0.01	0.11

Chan, 1998; Guerrero, 2002; Gasser, 1996.

Dado los resultados obtenidos a nivel genotipo en el presente trabajo, no se puede asegurar que el fenotipo metabolizador lento no este asociado como factor de riesgo en la etiología de la enfermedad de Parkinson en la población mestiza mexicana, ya que como se ha mencionado anteriormente, el gen *CYP2D6* es muy polimórfico y en este trabajo solo se analizaron los alelos *CYP2D6**3 y *CYP2D6**4.

Por lo tanto, se recomienda llevar a cabo un estudio farmacocinético que mida la actividad enzimática de la *CYP2D6* para la obtención del fenotipo de la población estudiada en el presente

trabajo; ya que al poder comparar el fenotipo con el genotipo ya analizado en este trabajo, se puede detectar más fácil otro polimorfismo genético no analizado, y tener así los elementos para asegurar la asociación del fenotipo MP con la etiología de la EP. Si el estudio farmacocinético y el genotípico presentaran el mismo fenotipo en cada paciente, la conclusión de este estudio se corroboraría; de no ser así, se podría esperar la presencia de alguna otra mutación del gen *CYP2D6* no analizada en este estudio, ya que como anteriormente se ha mencionado, se han identificado más de 70 alelos diferentes para este gen, de los cuales, en este trabajo solo se analizaron dos (*CYP2D6**A y *B).

Secuenciando el gen *CYP2D6* de las muestras donde el fenotipo no haya coincidido con el genotipo, y comparando estas con la secuencia normal del gen (estudio farmacocinético y genotípico), se podría identificar la mutación que estuviese presente en estos pacientes, la cual en teoría, no debiera ser ni la mutación *A ni la *B, sino tal vez, alguna otra (reportada o no reportada). Por otra parte, si no se encontraran diferencias en la secuencia del gen, se podría esperar un error en el estudio farmacocinético, debido tal vez, a la presencia de alguna o algunas variables que estuviesen interfiriendo en este. Como pudieran ser, las diferencias interindividuales a la respuesta metabólica, algún trastorno en hígado, la interacción entre medicamentos en su tratamiento, los hábitos de alimentación del paciente, e incluso el engaño del paciente al tomar el fármaco testigo, o al hacer la recolección de orina, entre otros.

VIII. Conclusiones

8. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir:

- ➊ Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas en el grupo control como en el de pacientes con EP, podemos asegurar, que no existe asociación de los alelos mutados estudiados en este trabajo (*CYP2D6*3* y *CYP2D6*4*) como factor de riesgo en la etiología de la enfermedad de Parkinson.

Ya que hasta la fecha no se ha reportado ningún trabajo que estudie la frecuencia de algún polimorfismo del gen *CYP2D6* en población mestiza mexicana, podemos dar a conocer las frecuencias encontradas del alelo funcional *CYP2D6*1*, como el de los alelos no funcionales *CYP2D6*3* y *CYP2D6*4* tanto en población mestiza mexicana mayor de 50 años sin indicios de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa, como en pacientes mestizo mexicanos con enfermedad de Parkinson idiopática.

- ➋ El alelo que se presenta con mayor frecuencia tanto en población mestiza mexicana sin indicios de presentar alguna enfermedad neurodegenerativa mayor de 50 años como en pacientes mestizo mexicanos con EP idiopática, fue el alelo funcional *CYP2D6*1* (88% y 87%, respectivamente).
- ➌ El alelo no funcional *CYP2D6*3* fue el menos frecuente (1%) tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con EP idiopática.
- ➍ El alelo no funcional *CYP2D6*4* se presenta en un 11% en la población control, y en un 12% en pacientes con EP idiopática.

- El genotipo homocigoto normal $^{*w}/^{*w}$ se presentó con una frecuencia del 76% en el grupo control *versus* 73% en el grupo de pacientes.
- El homocigoto mutado $^{*3}/^{*3}$ no se presentó ni en el grupo de pacientes ni en el de controles; sin embargo, el genotipo heterocigoto $^{*w}/^{*3}$ se presentó en una frecuencia del 2% tanto en el grupo control como en el de pacientes.
- El genotipo homocigoto mutado $^{*4}/^{*4}$ solo se hizo presente en el grupo de pacientes con una frecuencia del 2%; sin embargo, el genotipo heterocigoto $^{*w}/^{*4}$ se presentó en una frecuencia del 22% en el grupo control *versus* 23% en el grupo de pacientes.
- Al hacer la correlación de fenotipos, podemos ver que el 100% de la población control *versus* el 98% de los pacientes estudiados en este trabajo presentan el fenotipo metabolizador extenso, indicando que presentan una actividad enzimática (CYP2D6) normal.

IX. Anexos

9.1 Preparación de reactivos

Amortiguador de lisis de glóbulos rojos (*RCLB*)

Cantidad necesaria para preparar 1 L de solución

- TRIS 1 M pH 7.6 10 ml
- MgCl_2 1 M 5 ml
- NaCl 5 M 2 ml
- Aforar con H_2O desionizada estéril

NOTA: Esterilizar por filtración ($\varnothing$ 0.22 μm) y almacenar a temperatura ambiente.

TRIS 1 M

Cantidad necesaria para preparar 1 L de solución

- 121.14 g de TRIS-base SIGMA[®]
- Ajustar pH con HCl concentrado
 - pH 7.4 70 ml
 - pH 7.6 60 ml
 - pH 8.0 42 ml
- Aforar con H_2O desionizada estéril

NOTA: Esterilizar en autoclave (15psi) y almacenar a temperatura ambiente.

Cloruro de magnesio (MgCl_2) 1 M

Cantidad necesaria para preparar 1 L de solución *stock*

- MgCl_2 1 M 203.3 g
- Aforar con H_2O desionizada estéril

NOTA: Esterilizar en autoclave (15psi) y almacenar a temperatura ambiente.

Cloruro de sodio (NaCl) 5 M

Cantidad necesaria para preparar 1 L de solución *stock*

- NaCl 5 M 292.5 g
- Aforar con H_2O desionizada estéril

NOTA: Esterilizar en autoclave (15psi) y almacenar a temperatura ambiente.

✚ Dodecil sulfato de sodio (**SDS**) 10% pH 7.2

Cantidad necesaria para preparar 1 L de solución

- SDS grado electroforético 100.0 g
- H₂O desionizada estéril 900.0 ml
- Disolver a 68° C
- Ajustar el pH a 7.2 con unas gotas de HCl (0.5 M)

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

✚ Solución de **FENOL** saturado

Cantidad necesaria para preparar aproximadamente 1 L de solución

- Fundir FENOL saturado en baño maría a 68° C
- 480 ml de FENOL fundido
- 320 ml H₂O desionizada estéril
- 3.2 ml β-Mercaptanol
- 6.4 ml TRIS 1 M pH 8
- 480 mg 8-Hidroxiquinolina
- Mezclar la solución toda la noche protegiéndola de la luz
- Ajustar el pH a 7.6 con NaOH 20 N

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a 4° C.

✚ Solución de **FENOL : CLOROFORMO : ALCOHOL ISOAMÍLICO**

Cantidad necesaria para preparar 500 ml de solución (25 : 24 : 1)

- Solución de Fenol saturado 250 ml
- Cloroformo (absoluto) 240 ml
- Alcohol isoamílico (absoluto) 10 ml

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a 4° C.

✚ Solución de **CLOROFORMO : ALCOHOL ISOAMÍLICO**

Cantidad necesaria para preparar 500 ml de solución (24 : 1)

- Cloroformo 480 ml
- Alcohol isoamílico 20 ml

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a 4° C.

✚ Amortiguador TRIS – Borato (*TBE 10 X*)

Cantidad necesaria para preparar 2 L de solución *stock*

- TRIS-base SIGMA® 216.0 g
- Ácido bórico 110.0 g
- EDTA 18.6 g
- Aforar con H₂O desionizada estéril

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

✚ Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Cantidad necesaria para preparar 5 ml de solución *stock*

- Bromuro de etidio 50.0 mg
- H₂O desionizada estéril 5.0 ml

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

✚ Si se requiere hacer una disolución de alguna de las soluciones stock antes mencionadas, utilizar la siguiente fórmula:

$$(C_1) (V_1) = (C_2) (V_2)$$

Donde:

C_1 = Concentración 1

V_1 = Volumen I

C_2 = Concentración 2

V_2 = Volumen 2

9.2 Preparación de geles y colorantes para geles no desnaturalizantes

✚ Gel de agarosa al 0.8 %

Cantidad necesaria para preparar 250 ml de gel

- Agarosa 2 g
- Amortiguador TBE 0.5 X 248 ml
- Disolver y homogeneizar con calentamiento

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

🔧 Gel de agarosa al 3.0 %

Cantidad necesaria para preparar 250 ml de gel

- Agarosa 7.5 g
- Amortiguador TBE 0.5 X 242.5 ml
- Disolver y homogeneizar con calentamiento

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

🔧 Gel de poliacrilamida al 8.0 %

Cantidad necesaria para preparar 70.042 ml de gel

- H₂O desionizada estéril 48.3 ml
- TBE 10 X 7.0 ml
- Acrilamida al 40 % 14.0 ml
- Persulfato al 10 % 700.0 µl
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) 42.0 µl

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

🔧 Gel de poliacrilamida al 15 %

Cantidad necesaria para preparar 70.042 ml de gel

- H₂O desionizada estéril 36.0 ml
- TBE 10 X 7.0 ml
- Acrilamida al 40 % 26.3 ml
- Persulfato al 10 % 700.0 µl
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) 42.0 µl

NOTA: No es necesario esterilizar; almacenar a temperatura ambiente.

🔧 Acrilamida al 40%

Para preparar 500 ml de solución

- Acrilamida 193.35 g
- Bisacrilamida 6.65 g
- Disolver en 250 ml de agua desionizada estéril 250.00 ml
- Llevar a 500 ml con agua desionizada estéril 50.00 ml

NOTA: Proteger de la luz y almacenar a 4° C.

9.3 Preparación de colorantes para geles no desnaturizantes

A)

- Azul de bromofenol 0.25%
- Xilén cianol FF 0.25%
- Glicerol 30.0%
- Agua desionizada estéril 69.5%

NOTA: Almacenar a 4° C.

B)

- Azul de bromofenol 0.25%
- Xilén cianol FF 0.25%
- Ficol tipo 400 15.0%
- Agua desionizada estéril 84.5%

NOTA: Almacenar a temperatura ambiente.

9.4 Secuencia normal del gen *CYP2D6*

1: M33388. Human cytochrome Related Sequences, OMIM, Protein, PubMed, Taxonomy,
 ...[gi:181303] UniSTS, LinkOut
 LOCUS HUMCYP2D6 9432 bp DNA linear PRI 22-NOV-1994
 DEFINITION Human cytochrome P450 IID6 (CYP2D6) gene, complete cds.
 ACCESSION M33388
 VERSION M33388.1 GI:181303
 KEYWORDS cytochrome P450; cytochrome P450 IID6.
 SOURCE Human DNA, clone lambda2D-18/2.
 ORGANISM *Homo sapiens*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 9432)
 AUTHORS Kimura,S., Umeno,M., Skoda,R.C., Meyer,U.A. and Gonzalez,F.J.
 TITLE The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and
 identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a
 pseudogene
 JOURNAL Am. J. Hum. Genet. 45 (6), 889-904 (1989)
 MEDLINE 90072069
 PUBMED 2574001
 COMMENT Draft entry and computer-readable sequence for [Am. J. Hum. Genet.
 45, 889-904 (1989)] kindly submitted
 by S.Kimura, 29-MAR-1990.

FEATURES	Location/Qualifiers
<u>source</u>	1..9432 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxon:9606" /map="22q13.1"
<u>mRNA</u>	join(1532..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626, 4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5909) /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127" /product="cytochrome P450 IID6"
<u>exon</u>	1532..1799 /partial /gene="CYP2D6" /note="cytochrome P450 IID6; G00-132-127" /number=1
<u>gene</u>	join(1532..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626, 4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5909) /gene="CYP2D6"
<u>CDS</u>	join(1620..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626, 4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5836) /gene="CYP2D6" /codon_start=1 /product="cytochrome P450 IID6" /protein_id="AAA53500.1" /db_xref="GI:181304" /db_xref="GDB:G00-132-127" /translation="MGLEALVPLAVIVAI FLLLVDLMHRRQRWAARYPPGPLPLPGLG NLLHVDFQNTPYCFDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRP PVPITQILGFGPRSQGVFLARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACL CAAFANHSGRPFPRNGLLDKAVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLLDLAQEGLKEESG FLREVLNAV PVLLHIPALAGKVLRFQKAFLTQLDELLTEHRMTWDPAPPPRDLTEAFL AEMEKAKGNPESFNDENLRIVVADLFSAGMVTSTTTLAWGLLLMILHPDVQRRVQQE IDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVIHEVQRFQDIVPLGVTHMTSRDIEVQGFRI PKG TTLITNLSSVLKDEAVWEKPFRRFHPHFDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRACLGEPLAR MELFLFFTSLQLHFSFSVPTGQPRPSHHGVFAFLVSPSPYELCAVPR"
<u>intron</u>	1800..2502 /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127" /number=1
<u>exon</u>	2503..2674 /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127" /number=2
<u>intron</u>	2675..3224 /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127; does not fit consensus" /number=2
<u>exon</u>	3225..3377 /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127" /number=3
<u>intron</u>	3378..3465 /gene="CYP2D6" /note="G00-132-127" /number=3
<u>exon</u>	3466..3626

```

        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=4
intron  3627..4059
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=4
exon    4060..4236
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=5
intron  4237..4426
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=5
exon    4427..4568
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=6
intron  4569..4775
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=6
exon    4776..4963
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=7
intron  4964..5417
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=7
exon    5418..5559
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=8
intron  5560..5657
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=8
exon    5658..5909
        /partial
        /gene="CYP2D6"
        /note="G00-132-127"
        /number=9
BASE COUNT      1964 a    2647 c    2976 g    1845 t
ORIGIN
   1 gaattcaaga ccagcctgga caacttgga gaaccgggtc tctacaaaa atacaaaatt
  61 agctgggatt ggggtgcggtg gctcatgcct ataatcccag cactttggga gcctgaggtg
 121 ggtggatcac ctgaagtcag gagttcaaga ctagcctggc caacatggtg aaaccctatc
 181 tctactgaaa atacaaaaag ctgacgtgg tggcacacac ctgtaatccc agctacttag
 241 gaggtctgagg caggagaatt gcttgaagcc tagaggtgaa ggttgtagtg agccgagatt
 301 gcatcattgc acaatggagg ggagccacca gcctgggcaa caagaggaaa tctccgtctc
 361 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaattag gctgggtggt gcctgtagtc ccagctactt
 421 gggaggcagg ggggtccactt gatgtcgaga ctgcagtgag ccatgatcct gccactgcac
 481 tccggcctgg gcaacagagt gagaccctgt ctaaagaaaa aaaaaataaa gcaacatata
 541 ctgaacaaag gatcctccat aacgttccca ccagatttct aatcagaaac atggaggcca

```

601 gaaagcagtg gaggaggacg accctcagge agcccgggag gatgttgtca caggctgggg
 661 caagggcctt ccggctacca actgggagct ctgggaacag ccctgttgca aacaagaagc
 721 catagcccgg ccagagccca ggaatgtggg ctgggctggg agcagcctct ggacaggagt
 781 ggtcccatcc aggaacctc cggcatggct gggaagtggg gtacttggtg ccgggtctgt
 841 atgtgtgtgt gactggtgtg tgtgagagag aatgtgtgcc ctaagtgtca gtgtgagtct
 901 gtgtatgtgt gaattattgtc tttgtgtggg tgattttctg cgtgtgtaat cgtgtccctg
 961 caagtgtgaa caagtggaca agtgtctggg agtggaacaag agatctgtgc accatcaggt
 1021 gtgtgcatag cgtctgtgca tgtcaagagt gcaaggtgaa gtgaaggac caggcccatg
 1081 atgccactca tcatcaggag ctctaaggcc ccaggtaagt gccagtgaca gataagggtg
 1141 ctgaagggtca ctctggagtg ggcagggtggg ggtagggaaa gggcaaggcc atgttctgga
 1201 ggaggggttg tgactacatt aggggtgtatg agcctagctg ggaggtggat ggccgggtcc
 1261 actgaaaccc tggttatccc agaaggcttt gcaggcttca ggagcttgga gtggggagag
 1321 ggggtgactt ctccgaccag gccctccac cggcctaccc tgggtaaggg cctggagcag
 1381 gaagcagggg caagaacctc tggagcagcc catacccgcc ctggcctgac tctgccactg
 1441 gcagcacagt caacacagca ggttcaactc cagcagaggg caaaggccat catcagctcc
 1501 ctttataaagg gaagggtcac gcgctcgggtg tgcctgagagt gtcctgcctg gtccctctgtg
 1561 cctgggtggg tgggggtgcc aggtgtgtcc agaggagccc atttggtagt gaggcaggtg
 1621 tggggctaga agcactggtg cccctggccg tgatagtggc catcttctctg ctctggttg
 1681 acctgatgca ccggcgccaa cgtgtggctg cagcctaccc accaggcccc ctgccactgc
 1741 ccgggtctgg caacctgctg catgtggact tccagaacac accatactgc ttcgaccagg
 1801 tgagggagga ggtcctggga ggcggcagag gtgctgaggc tcccctacca gaagcaaca
 1861 tggatggtgg gtgaaaccac agctgggacc agaagccagg ctgagaaggg gaagcaggtt
 1921 tgggggacgt cctggagaag ggcatttata catggcatga aggactggat tttccaaagg
 1981 ccaaggaaga gtagggaag ggcctggagg tggagctgga cttggcagtg ggcagcaag
 2041 cccattgggc aacatatgtt atggagtaca aagtccttc tgctgacacc agaaggaaag
 2101 gccttgggaa tgggaagtga gttagtctct agtgccgttt aaatcacgaa atcgaggatg
 2161 aaggggtgac agtgaccggg ttcaaacctt ttgcaactgt ggtcctcggg cctcactgcc
 2221 tcaccggcat ggaccatcat ctgggaatgg gatgctaact ggggcctctc ggcaattttg
 2281 gtgactcttg caaggtcata cctgggtgac gcatccaaac tgagtctctc catcacagaa
 2341 ggtgtgaccc ccacccccgc cccacgatca ggaggtctgg tctcctcctt ccacctgctc
 2401 actcctggta gccccggggg tcgtccaagg ttcaaatagg actaggacct gtagtctggg
 2461 gtgatcctgg cttgacaaga ggccttgacc ctccctctgc agttgcggcg ccgcttcggg
 2521 gacgtgttca gcctgcagct ggcctggacg ccggtgggtcg tgctcaatgg gctggcggcc
 2581 gtgcgcgagg cgctggtgac ccacggcgag gacaccggcg accgcccggc tgtgccatc
 2641 acccagatcc tgggtttcgg gcgcggttcc caaggcaagc agcgtggggg acagagacag
 2701 atttccgtgg gaccgggtg ggtgatgacc gtagtccgag ctgggcagag agggcgcggg
 2761 gtcgtggaca tgaaacaggc cagcgagtgg ggacagcggg ccaagaaacc acctgacta
 2821 gggaggtgtg agcatgggga cgaggcgggg gcttgtgacg agtggcgggg gccactgccg
 2881 agacctggga ggagcccaat ggggtgagcgt ggcgcatttc ccagctggaa tccggtgtcg
 2941 aagtgggggc ggggaccgca cctgtgctgt aagctcagtg tgggtggcgc ggggcccgcg
 3001 gggcttccc tgagtgcaaa ggcggtcagg gtgggcagag acgaggtggg gcaaagcctg
 3061 cccagccaa gggagcaagg tggatgcaca aagagtgggc cctgtgacca gctggacaga
 3121 gccagggact gcgggagacc agggggagca tagggttga gtgggtggtg gatgggtggg
 3181 ctaatgcctt catggccaag cgcacgtgcc cgtcccaccc ccagggtgt tcttgccg
 3241 ctatgggccc gcgtggcgcg agcagaggcg cttctccgtg tccaccttgc gcaacttggg
 3301 cctgggcaag aagtcgctgg agcagtgggt gaccgaggag gccgcctgcc tttgtgccg
 3361 ottcgcoaac caotccggtg ggtgatgggc agaaggcac aaagcgggaa ctgggaaggc
 3421 gggggacggg gaaggcgacc ccttaccgc atctccacc cccaggacgc cctttcgc
 3481 ccaacggtct cttggacaaa gccgtgagca acgtgatcgc ctccctcacc tgcgggcgc
 3541 gcttcgagta cgacgacct cgcttcctca ggctgctgga cctagctcag gaggactga
 3601 aggaggagt gggctttctg cgcgaggtgc ggagcgagag accgaggagt ctctgcagg
 3661 cgagctccc agaggtgcc gggctggact ggggcctcgg aagagcagga tttgcataga
 3721 tgggtttggg aaaggacatt ccaggagacc ccactgtaag aagggcctgg aggaggagg
 3781 gacatctcag acatggtcgt gggagagggtg tgcccgggtc agggggcacc aggagaggcc
 3841 aaggactctg tacctcctat ccacgtcaga gatttcgatt ttaggtttct cctctgggca
 3901 aggagagagg gtggaggctg gcacttgggg agggacttgg tgaggtcagt ggtaaggaca

3961 ggcaggccct ggggtctacct ggagatggct gggggcctgag acttggtccag gtgaacgcag
 4021 agcacaggag ggattgagac cccgttctgt ctggtgtagg tgcctgaatgc tgtccccgtc
 4081 ctccctgcata tcccagcgct ggctggcaag gtccctacgt tccaaaaggc tttcctgacc
 4141 cagctggatg **agctgctaao** **tgagcacagg** atgacctggg acccagccca gccccccga
 4201 gacctgactg aggccttcct ggcagagatg gagaagggtga gagggtgctgc cacggtgggg
 4261 ggcaagggtg gtgggttgag cgtcccagga ggaatgaggg gaggctgggc aaaagggttg
 4321 accagtgcac caccggcga gccgcacctg ggctgacagg tgcagaattg gaggctcatt
 4381 gggggctacc ccgttctgtc **ccgagtatgc** **tctcgg** cct gctcaggcca aggggaaccc
 4441 tgagagcagc ttcaatgatg agaacctgag catagtgtg gctgacctgt tctctgccgg
 4501 gatggtgacc acctcgacca cgtggcctg gggcctcctg ctcatgatcc tacatccgga
 4561 tgtgcagcgt gagcccatct gggaaacagt gcaggggccc agggaggaag ggtacaggcg
 4621 gggggccatg aactttgtct ggacaccggg ggctccaagc acaggcttga ccaggatcct
 4681 gtaagcctga cctcctccaa cataggaggc aagaaggagt gtcagggccg gacccctgg
 4741 gtgctgacct attgtgggga cgcagtgtctg tccaggccgt gtccaacagg agatcgacga
 4801 cgtgataggg caggtgcggc gaccagagat ggggtgaccag gctcacatgc cctacaccac
 4861 tgccgtgatt catgaggtgc agcgcttttg ggacatcgtc cccctgggtg tgaccatata
 4921 gacatcccgt gacatcgaag tacagggctt ccgcacctcc aaggtagggc tggcgccctc
 4981 ctacccccag ctacgacca gcacctgggt atagccccag catggctact gccagggtgg
 5041 cccactctag gaaccttggc cacctagtcc tcaatgccac cacactgact gtccccactt
 5101 ggggtggggg tccagagtat aggcagggtt ggctgtcca tccagagccc ccgtctagt
 5161 gggagacaaa ccaggacctg ccagaatgtt ggaggacca acgcctgcag ggagaggggg
 5221 cagtgtgggt gcctctgaga ggtgtgactg cgcctgtctg tgggttcgga gagggtactg
 5281 tggagcttct cgggcgcagg actagttgac agagtccagc tgtgtgccag gcagtgtgtg
 5341 tccccgtgtg gtttgggtgg aggggtccca gcacctaga gtccagtccc cactctcacc
 5401 ctgcattctc tgcccaggga acgacactca taccacacct gtcactgggt ctgaaggatg
 5461 aggcctgtct ggagaagccc ttccgcttcc accccgaaca ctccctggat gccaggggcc
 5521 actttgtgaa gccggaggcc ttccctgcct tctcagcagg tgccctgtgg gagcccggt
 5581 cctgtcccc ttccgtggag tcttgcagg gtatcaccca ggagccaggc tcaactgacg
 5641 cctccccctc cccacaggcc gccgtgcat cctcggggag cccctggccc gcatggagct
 5701 ctccctcttc ttcaacctcc tgcctgcaga cttcagcttc tcggtgccc ctggacagcc
 5761 ccggcccagc caccatggtg tctttgcttt cctgggtgag ccatccccct atgagctttg
 5821 tgctgtgccc cgctagaatg ggttacctag tccccagcct gctccctagc cagaggctct
 5881 aatgtacaat aaagcaatgt ggtagtcca actcgggtcc cctgctcag ccctcgttgg
 5941 gatcatcctc ctacaggcaa cccacccct gccctcattc tgcttaccct accgcctggc
 6001 cgcatttgag acaggggtac gttgaggctg agcagatgtc agttaccctt gcccataatc
 6061 ccatgtcccc cactgacca actctgactg cccagattgg tgacaaggac tacattgtcc
 6121 tggcatgtgg ggaagggggc agaatgggt gactagaggt gtcagtcagc cctggatgtg
 6181 gtggagaggg caggactcag cctggaggcc catatttcag gcctaactca gccacccca
 6241 catcagggac agcagtcctg ccagcaccat cacaacagtc acctcccttc atatatgaca
 6301 ccccaaaacg gaagacaaat catggcgtca gggagctata tgccagggtt acctacctcc
 6361 cagggtcagc tcggcagggt ccagaacgtt ccctgggaag gcccctgga agcccaggac
 6421 tgagccacca cctcagcct cgtcacctca ccacaggact ggctacctct ctgggcccctc
 6481 agggatgctg ctgtacagac cctgaccag tgacaggttc gcaactcagg ccaggctggc
 6541 gctggaggag gacacttgtt tggctccaac cctaggtacc atccctccag taggatcag
 6601 gcagggccca caggcctgcc ctagggacag gagtcaacct tggaccata aggcactggg
 6661 gcgggcagag aaggaggagg tggcatgggc agctgagagc cagagaccct gaccctagtc
 6721 cttgctctgc cattaccccg tgtgaccccg ggcccacct tccccacct tccccacctc
 6781 gggcttctgt ttcttctgtc caacgagaag gctgcttcac ctgccccgag tctgtcttc
 6841 ctgctctgcc ttctggggct gtggcccttg ctggcctgga gcccacacca agggcaggga
 6901 ctgctgtcct ccacgtctgt cctcacccag ataattgggt gggctgggca cacaggcagt
 6961 gcccagagat ttctaattgag catatgatta cctgagtcct gggcagacct tcttagggaa
 7021 cagcctggga cagagaacca cagacactct gaggagccac cctgaggcct cttttgccag
 7081 aggacctac agcctccctg gcagcagttc cgcagcatt tctgtaaatg cctcatgcc
 7141 aggggtcggc ccggctgtca gcacgagagg gacgttggtc tgtcccctgg caccaggtca
 7201 gtcagaaggg tggccagggc ccccttgggc cctccagag acaatccact gtggtcacac
 7261 ggctcgggtg cagggaagtgc tgttccctgca gctgtgggga caggaggtgt ggatgaagcc

```

7321 aggcctgggtt tgtctgaaga cggaggcccc gaaagggtggc agcctggcct atagcagcag
7381 caactccttg atttattgga aagattttct tcacgggtct gagtcttggg ggtgttagag
7441 gctcagaacc agtccagcca gagctctgtc atgggcacgt agaccgggtc ccagggcctt
7501 tgctctttgc tgtcctcaga ggcctctgca aagtagaaac aggcagcctt gtgagtcccc
7561 tcctgggagc aaccaaccct ccctctgaga tgccccgggg ccaggtcagc tgtggtgaaa
7621 ggtagggatg cagccagctc agggagtggc ccagagttec tgcccaccca aggaggctcc
7681 caggaaggtc aaggcacctg actcctgggc tgcttccctc ccctcccctc cccaggtcag
7741 gaagggtgga aagggtctgg gtgtctgtga ccctggcagt cactgagaag cagggtggaa
7801 gcagccccct gcagcacgct gggtcagtgg tcttaccaga tggatacgca gcaacttctt
7861 tttgaacctt tttattttcc tggcaggaag aagagggatc cagcagttag atcaggcagg
7921 ttctgtgttg cacagacagg gaaacaggct ctgtccacac aaagtccgtg gggccaggat
7981 gaggccagtc ctgttcacac atggctgtct cctctcagct ctgcacagac gtcctcgctc
8041 ccctgggatg gcagcttggc ctgctggtct tgggggttag ccagcctcca gcaactgctc
8101 cctgccctgc tgccctccac tctgcagtgc tccatggctg ctgagttgga cccacgctgg
8161 agacgttcag tcgaagcccc gggctgtcct tacctcccag tctgggttac ctgccacctc
8221 ctgctcagca ggaatggggc taggtgcttc ctcccctggg gacttcacct gctctccctc
8281 ctgggataag acggcagcct cctccttggg ggcagcagca ttcagtcctc caggtctcct
8341 gggggtctgt acctgcagga ggaataagag ggcagactgg gcagaaaggc cttcagagca
8401 cctcatcctc ctgttctcac actggggtgt cagagtcctg ggaagtctct ccttttcagt
8461 tgagctgttg taaccttgtg agtttcctgg agggggcctg ccactaccct tgggactccc
8521 tgccgtgtgt ctgggtctaa ctgagctctg aaaggagaga gcccagccc tgggccttcc
8581 aggggaagcc ttacctcaga ggttggtctc ttcctactct tgactttgct tctctgcaga
8641 gggagggtgg aggggtgaca caacctgac acccacacta tgagttagta gtagtcctgc
8701 cccgactggc ccactccttc cagggtcagt ccccttact gtgtctgcca aggggtccag
8761 cacagccgcc ccactccagg ggaagaggag tgccagccct taccacctga gtgggcacag
8821 tgtagcattt attcattagc cccacactg gcctgacct ctcccctgtg ggctgcatga
8881 caaggagaga gaacaggctg aggtgagagc tactgtcaac acctaaacct aaaaaatcta
8941 taattgggct gggcagggtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggga ggccgagatg
9001 ggtggatcac ctgaggtcag atgttcgaga ccagcctggc caacatgggtg aaaccccgtc
9061 tctactaaaa atacaaaaaa ttagctgggc gtgggtgggtg gtgcctgtaa tcccagctac
9121 tcaggaggct gaggcaggag aattgcttga acctgggagg cagaggctgc agtgagccga
9181 gatcgcatca ttgactcca gcctggtcaa caagagtga actgtcttaa aaaaaaatc
9241 tataattgat atcttttaga agataaaaact ttgcattcat gaaataagaa taggagggtc
9301 taaaataaaa atgttcaaac acccaccacc actaattctt gacaaaaata tagtctgggt
9361 gccttagctc atgcctgtaa tcccagcatt ttgggagggt aaggcaggag gattgtttga
9421 gcctaggaat tc

```

//
Revised: October 24, 2001 (<http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer.fcgi>).

X. Bibliografía

10. Bibliografía

1. **Agudez J.**, Ledesma M., Laredo J., y Benitez J. **1994**. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther.* 57: 265-269.
2. **Aiache**, Devissaguet, y Guyot. **1983**. Biofarmacia, Edit. El Manual Moderno, México, D.F; pp.55.
3. **Aklillu E.**, Persson I., Bertilsson L., Johansson I., Rodríguez F., y Ingelman-Sundberg M. **1996**. Frequency distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther.* 278: 441-446.
4. **Alcaraz ZM.**, Montes S., y Ríos C. **2001**. Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by copper sulfate against 1-Metil-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Brain Research Bulletin.* 55 (2): 277-279.
5. **Armstrong M.**, Daly AK., Cholerton S., Bateman DN., y Idle JR. **1992**. Mutant Desbrisoquine Hydroxylation genes in Parkinson's disease. *The Lancet.* Apr 25, 339 (8800): 1017-1018.
6. **Athanassiadou A.**, Voutsinas G., Psiouri L., Leroy E., Polymeropoulos MH., Ilias A., et al. **1999**. Genetic analysis of families with Parkinson's disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am J Hum Gene.* 65: 555-558.
7. **Bandmann O.**, Vaughan J., Holmans P., Marsden C.D., y Word N.W. **1997**. Association of show acetylation genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *The Lancet.* 350: 1136-1139.
8. **Barbeau A.**, Roy M., Paris S., Cloutier T., Plasse L., Poirier J. **1985**. Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *The Lancet.* 2: 1213-1215.
9. **Benny KA.**, y Adithan C. **2001**. Genetic polymorphism of CYP2D6. *Indian Journal of Pharmacology.* 33: 147-169.
10. **Bernard CS.**, Jeanette B., Naziha N., y Steven HW. **2001**. Genotyping of cytochrome P450 2D6 3* and *4 mutations using conventional PCR. *Clin. Chim. Ac.* 308: 25-31.
11. **Bertilsson L.**, Dahl ML., y Tybring G. **1997**. Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psych Scand.* 96: 14-21.
12. **Blum D.**, Torch S., Lambeng N., Nissou MF., Benabid AL., Sadoul R., y Verna JM. **2001**. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* 65: 135-172.
13. **Bordet R.**, Broly F., Destée A., Libersa Ch., y Lafitte J. **1996**. Lack of relation between genetic polymorphism of cytochrome P-450IID6 and sporadic idiopathic Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology.* 19 (3): 213-221.
14. **Bowie LJ.**, Reddy PL., Nagabhushan M., y Sevigny P. **1994**. Detection of α -thalassemias by multiplex polymerase chain reaction. *Clin Chem.* 40: 2260-2266.

15. **Broser K. 1996.** Drug-Metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Ther Drug Monit.* 18: 393-396.
16. **Cervantes PA., López LM., Sandoval H., y Del Muro R. 2001.** ¿Farmacia, Farmacogenética, Farmacogenómica?. *Rev Mex Cien Farm.* 32 (4): 11-19.
17. **Chan DKY., Woo J., Ho SC., Pang CP., Law LK., Ng PW., Hung WT., Kwok T., Hui E., Orr K., Leung MF., y Key R. 1998.** Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population. *J Neurol, Neurosurg and Psychiatry.* 65: 781-784.
18. **Chen X., Xia Y., Gresham LS., Molgaard CA., Thomas RG., Galasko D., Wiederholt WC., y Saitoh T. 1996** ApoE and CYP2D6 polymorphism with and without parkinsonism-dementia complex in the people of chamorro. *Guam. Neurology,* 47 (3): 779-84.
19. **Coleman T., Ellis W., Martin I., Lennard M. y Tucker G. 1996.** 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) is N-Demethylated by Cytochromes P450 2D6, 1A2, and 3A4-Implications for Susceptibility to Parkinson's Disease. *Journal Pharmacol and Experimental Therapeutics.* 277 (2): 685-690.
20. **Dahl ML., Yue KY., Roh HK., Johansson I., Säwe J., Sjöqvist F., y Bertilsson L. 1995.** Genetic analysis of the CYP2D6 locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics.* 5: 159-164.
21. **Dawson Ted M. 2000.** New animal models for Parkinson's disease. *Cell.* 101: 115-118.
22. **De Palma G., Mozzoni P., Mutti A., Calzetti S., y Negrotti A. 1998.** Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease. *The Lancet.* 352 (9145):1986-1987.
23. **De Silva HR., Khan NL., y Wood NW. 2000.** The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opinion Neurol.* 10: 292-298.
24. **Destenaves B., y Thomas F. 2000.** New advances in pharmacogenomics. *Curr OPChem Biol.* 4: 440-444.
25. **Diederich N., Hilger C., Goetz CG., Keipes M., Hentges F., Vieregge P., y Metz H. 1996.** Genetic variability of the CYP 2D6 gene is not a factor for sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 40: 463-465.
26. **Foltynie T., Sawcer S., Brayne C., y Braker RA. 2002.** The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 73: 363-370.
27. **Farrer M., Gwinn-Hardy K., Muenter M., DeVrieze FW., Crook R., Pérez-Tur J., et al. 1999.** A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet.* 8: 81-85.
28. **Forrester LM., Henderson CJ., Glancy MJ., et al. 1992.** Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drug and xenobiotics. *Biochem J.* 9: 281- 359.
29. **Gaedigk A. 1999.** Ethnic factors: Implications for drug therapy and global drug development. AGAH Annual Meeting '99, *International J Clin Pharmacol Ther.* 37 (4): 193-206.
30. **Galli E., y Feijoo L. 2002.** Citocromo P-450 y su importancia clínica revisión actualizada. *Revista de Neuro-Psiquiatría.* 65: 187-201.
31. **García de Yébenes J. 2001.** Genética de la enfermedad de Parkinson. *Neurología;* 16: 1-6.

-
32. **García Ruiz PJ.** y Meseguer E. 2002. Breve historia de la L-Dopa. *Neurología*. 17 (4): 214-217.
 33. **García-Ruiz PJ.**, García de Yébenes J., Jiménez-Jiménez FJ., Vázquez A., García Urra D., y Morales B. 1992. Parkinsonism associated with calcium channel blockers. *Clin Neuropharmacol*. 15: 19-26.
 34. **Gasser T.**, Müller-Myhsok B., Supala A., Zimmer E., Wieditz G., Wszolek ZK., Vieregge P., Bonifati V. y, Oertel WH. 1996. The CYP2D6 allele is not over represented in a population of German patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 61: 518-520.
 35. **Gasser T.**, Müller-Myhsok B., Wszolek ZK., Oehlmann R., Calne DB., Bonifati V., et al. 1998. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*. 18: 262-265.
 36. **González F. J.** 1989. The Molecular Biology of Cytochrome P450. *Pharmacol Rev*. (4): 243-288.
 37. **González F. J.** 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 13: 346-352.
 38. **Goodman & Gilman.** The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed., Ed. McGraw-Hill. EEUU, 1996.
 39. **Goowers WR.** 1893. A manual of disease of the nervous system. Philadelphia: Blakiston.
 40. **Guerrero D.**, García M., Larumbe R., Vizmanos J., Novo F., y Viñes J. 2002. Prevalencia de mutaciones *CYP2D6* en enfermedad de Parkinson esporádica: estudio caso-control. *ANALES Sis San Navarra*. 25 (2): 147-154.
 41. **Ingelman-Sundberg M.** 1999. Duplication, multiduplication and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological and clinical pharmacological aspects. *Drug Metab Rev*. 31: 449-459.
 42. **Iwahashi K.**, Miyatake R., Tsuneoka Y., Matsuo Y., Ichikawa Y., Hosokawa K., Sato K., y Hayabara T. 1995. A novel cytochrome P-450IID6 (CYP2D6) mutant gene associated with multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 58 (2): 263-264.
 43. **Johansson I.**, Oscarsson M., Yue KY., Bertilsson L., Sjöqvist F., y Ingelman-Sundberg M. 1994. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P450 locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*. 46: 452-459.
 44. **Kalow W.**, Otton SV., Kadar, Endrenyi L., y Inaba T. 1980. Ethnic difference in drug metabolism: debrisoquine 4-hydroxylation in Caucasians and Orientals. *Can J Physiol Pharmacol*. 58: 1142-1144.
 45. **Kalow W.**, y Grant D. M. "Pharmacogenetics". *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. 8th ed. USA, 2001, Ed. Mc Graw Hill, Inc.; pp. 225 – 255.
 46. **Kimura S.**, Umeno M., Skaoda RC., Gelboin HV., Meyer UA., y González F. J. 1989. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 45: 889-904.
 47. **Kruger R.**, Kuhn W., Müller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., et al. 1998. ALA30PRO mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 18: 106-108.

-
48. **Leighton PW.**, Le Couteur DG., Pang CCP., McCann SJ., Chan D., Law LK., Kay R., Pond SM., y Woo J. **1997**. The dopamine transporter gene and Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurology*. 49: 1577-1579.
 49. **Leroy E.**, Boyer R., Auburger G., Lcube B., Ulm G., Meczy E., et. al. **1998**. The ubiquitine pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 395: 451-452.
 50. **Linder MW**, Prough RA, Valdes R. **1997**. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*. 43: 254-256.
 51. **LoH**, Chen C., Hogan E., Kao K., Want V., y Yan S. **1998**. Genetic polymorphism and Parkinson's disease in Taiwan: study of desbrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6). *J Neurol Sci*. 158 (1): 38-42.
 52. **Lovlie R.**, Daly AK., Matre GE., Molve A., y 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.
 53. **Mahgounb A.**, Idle JR., Smith RL. **1979**. A population and familial study of the defective alicyclic hidroxilation of desbrisoquine among Egyptians. *Xenobiotica*. 9:51-56.
 54. **Maniatis T.**, Fritsch E., y Sambrook J. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*; 4th ed, N.Y. 1982.; Ed. Cold Spring Harbor Laboratory; pp. 270 – 307.
 55. **Mazzetti P.**, Le Guern E., Bonnet AM., Vidailhet M., Brice A., y Agid Y. **1994**. Familial Parkinson's disease and polymorphism at the CYP2D6 locus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 57 (7): 871-872.
 56. **McCann SJ.**, Pond SM., James KM. y Le Couteur DG. **1997**. The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J. Neurological Sciences*. 153: 50-53.
 57. **McKinnon RA.**, y Evans AM. **2000**. Cytochrome P450 2. Pharmacogenetics. *Aust J Hosp Pharm*. 30: 102-105.
 58. **McLellan RA.**, Oscarson M., Seidegard J., Evans DAP., y Ingelman-Sundberg M. **1997**. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*. 7: 187-191.
 59. **Mellick GD.**, Buchanan DD., Silburn PA., Chan DKY., y Couteur DG. **2000**. The monoamine oxidase B gene GT repeat polymorphism and Parkinson's disease in a Chinese population. *J Neurol*. 247: 52-55
 60. **Meyer UA**. **1994**. Pharmacogenetics: the slow, the rapid and the ultra rapid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 1983-1984.
 61. **Mjones H**. **1949**. Paralysis agitans; clinical and genetic sutudy. *Acta Psychiat Neurol*. 54 (suppl): 1-194.
 62. **Mori H.**, Kondo T., Yokochi M., Matsumine H., Nakagawa Hatorri Y., Miyake T., et al. **1998**. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*. 51: 890-892.
 63. **Motulsky A**. **1957**. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA*. 165; 835-837.
 64. **Mulvihill JJ**. **1985**. Clinical ecogenetics-cancer in families. *N Engl J Med*. 312: 1569-1570.

-
65. **Murray M. 1992.** P450 Enzymes, Inhibition Mechanisms, Genetic Regulation and Effects of Liver Disease. *Clin Pharmacokinetic Concepts*. 23 (2): 132-146.
 66. **Myrianthopoulos NC., Waldrop FN., y Vincent B. L. 1967.** A repeat study of hereditary predisposition in drug induced parkinsonism. En: Barbeau A, Brunette JR, editores. *Progress in Neurogenetics*. Amsterdam: Excerpta Medica. 175: 486-491.
 67. **Nebert DW., Nelson DR., Coon MJ., et. al. 1991.** The P450 superfamily : Update listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA Cell Biol*. 10: 1-4.
 68. **Nebert DW., McKinnon RA., Puga A. 1996.** Human drug metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 15: 273-278.
 69. **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.
 70. **Nelson DR., Kamataki T., Waxman DJ., et. al. 1993.** The P450 superfamily : update on new sequences gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. 12: 1-51.
 71. **Nicholl DJ., Bennet P., Hiller L., Bonifati V., et. al. 1999.** A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. European Study Group on Atypical Parkinsonism. *Neurology*. 53 (7): 141-21.
 72. **Payami H. Lee N., Zarepari S., Gonzalez McNeal M., Camicioli R., Bird T. D., et. al. 2001.** Parkinson's disease, CYP2D6 polymorphism, and age. *Neurology*. 56 (10): 1363-1370.
 73. **Planté-Bordeneuve V., Davis MB., Maraganore DM., Marsden CD., y Harding A. E. 1994.** Desbrisoquine hydroxylase gene polymorphism in familial Parkinson's disease. *J Neurol Psychiatry*. 57 (8): 911-913.
 74. **Polymeropoulos MH., Lavedan C., Leroy E., Tde SE., Dehejia A., Dutra A., et al. 1997.** Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276: 2045-2047.
 75. **Poulsen HE., y Loft S. 1994.** The impact of genetic poly morphisms in risk assessment of drugs. *Arch Toxicol Suppl*. 16: 211-212.
 76. **Riesenman C. 1995.** Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 systems: A critical appraisal. *Pharmacotherapy*. 15 (6 Pt 2): 845-995.
 77. **Rojas P., Garduño B., Rojas C., Vigueras R., Rojas J., Ríos C. y Serrano N. 2001.** EGb761 Blocks MPP+ - Induced Lipid Peroxidation in mouse Corpus Striatum. *Neurochemical Research*. 26 (11): 1245-1251.
 78. **Rowland M., y Tozer T.** Clinical pharmacokinetic concepts and application, 3ª ed., Ed. Lea & Febiger Book, Sn. Francisco California U.S.A. 1995. pp. 221.
 79. **Sachse C., Brockmöller J., Hildebrand M., Müller K., y Roots I. 1998.** Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics*. 8: 181-185.
 80. **Sambrook J., Fritsh EF., y Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York 1989.

81. **Sandy MS.**, Armstrong M., Tanner CM., Daly AK., Di Monte DA., et. al. 1996. CYP2D6 allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* . 47 (1): 225-230.
82. **Schur B.**, Bjerke J., Nuwayhid N., y Wong S. 2001. Genotyping of cytochrome P450 2D6*3 and *4 mutations using conventional PCR. *Clinical Chimica Acta*. 308:25-31.
83. **Scott WK.**, Nance M., Watts R., Hubble J., Koller W., Lyons K., Pahwa R., Stern M., Colcher A., Hiner B, y cols. 2001. Complete genomic screen in Parkinson disease. Evidence for multiple genes. *JAMA*. 286 (18): 2239-2244.
84. **Shen WW.** 1997. The metabolism of psychoactive drugs: A review of enzymatic biotransformation and inhibition. *Biol Psychiatry*. 41: 814-826.
85. **Shimada T.**, Yamazaki H., Mimura M., et al. 1994. Individual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians. *J. Pharmacol Exp Ther.* 270: 414.
86. **Smith CAD.**, Gough AC., Leigh PN., Summers BA., Harding AE., Maranganore DM., Sturman SG., Scapira AHV., Williams AC., Spurr NK., y Wolf CR. 1992. Desbrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility tp Parkinson's disease. *The Lancet*. 339: 1375-1377.
87. **Steven JL.**, y Kearns GL. 1997. Pharmacogenetics in pediatrics. *Pediatric Clinics of North America*. 44 (1): 55-77.
88. **Suzuki T.**, Fujita S., Narimatsu S., Masubuchi Y., Tachibana M., Ohta S., y Hirobe M. 1992. Cytochrome P450 isozymes catalyzing 4-hydroxylation of parkinsonism-related compound 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in rat liver microsomes. *FASEB J*. 6: 771-776.
89. **Tan EK.**, Khajavi, Thornby JL., Nagamitsu S., JAnkovic J., y Ashizawa T. 2000. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology*. 55 Aug(2of2): 533-538.
90. **Tanaka S.**, Matoh N., y Ueda K. 1998. CYP2D Microsatellite polymorphism in Lewy body variants of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *ICR Annual Report*. 5: 42-43.
91. **Takahashi H.**, Ohama E., Suzuki S., Horikawa Y., Ishikawa A., Morita T., et. al. 1994. Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology*. 44: 437-441.
92. **Tucker GT.**, Silas JH., Lyun AO., Iennard MS., Smith A. J. 1997. Polymorphic hydroxylation of desbrisoquine in man. *The Lancet*. ii: 718.
93. **Vogel F.**, y Motulsky A. G. Human genetics. Problem and approaches, 2ª ed ,USA1986. Ed. Berlin: Springer-Verlag.
94. **Wallace R.W.** 1999. Pharmacogenomics: the next logical step. *Drug Discovery Today*. 4: 105-107.
95. **Wang SL.**, Huang JD., Lai MD., Liu BH., y 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.

-
96. **Wilhelmsen K.**, Mirel D., Mardet K., Bernstein M., Naini A., Leal SM., Cote LJ., Tang MX., Freyer G., Graziano J., y Mayeux R. 1997. Is there a genetic susceptibility locus for Parkinson's disease on chromosome 22q13? *Annals of Neurology*. 41 (6): 813-817.
 97. **Wrighton SA.**, y Stevens JC. 1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism, *CRC Crit Rev Toxicol*, 22 (1).
 98. **Youdim M.** y Riederer P. 1997. Understanding Parkinson's Disease. *Scientific American*. January: 38-45.
 99. **Young R.** 1999. Update on Parkinson's Disease. *American Family Physician*. April 15: <http://www.aafp.org/afp/990415ap/2155.html>
 100. <http://www.cadime.com> Cámara de Instituciones de Diagnóstico Médico. Parkinson: Una enfermedad con aspectos poco conocidos. <http://www.cadime.com.ar/comunidad/1#1>
 101. <http://www.ninds.nih.gov> National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Enfermedad de Parkinson: Esperanza en la Investigación. Publicación de National Institutes of Health (NIH) No. 00-139, Revisado en Julio del 2001. http://www.ninds.nih.gov/health_and_medical/pubs/top#top
 102. <http://www.ssa.gob.mx> COMUNICADO DE PRENSA No. 535 (23 / diciembre / 2000). 50 De cada 100 mil mexicanos padecen de Parkinson, a partir de los 55 años.
 103. <http://www.ssa.gob.mx> COMUNICADO DE PRENSA No. 047 (10 / abril / 2001). La enfermedad de Parkinson afecta a 50 de cada 100 mil mexicanos.
 104. <http://www.ssa.gob.mx> ¿Qué es la enfermedad de Parkinson? <http://ssa.gob.mx/unidades/conadic/abcpark.htm>
 105. <http://www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/parquinson/>
 106. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> o URL: <http://www.imm.ki.se/cypalleles> Homepage del Comité de Nomenclatura Alélica del Citocromo P450 Humano (CYP).
 107. <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer.fcgi> National Center by Biotechnology Information. Locus (Buscar: Nucleótido; para: M33388). Human Cytochrome P450 IID6 (CYP2D6), complete cds. gi|181303|gb|M33388.1|HUMCYP2D6[181303]. Ver también la página Web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi> (Cromosoma: 22; y buscar: CYP2D6).