

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana
Centro Nacional de Genética Médica (CNGEN)

Frecuencia de la variante alélica CYP2D6*6 en una muestra de la población cubana

Frequency of allelic variant CYP2D6*6 in a sample of the Cuban population

Hilda Roblejo Balbuena^I, Ileana Rosado Ruiz-Apodaca^{II}, Antonio Alejandro Esperón Álvarez^{III}, Teresa Collazo Mesa^{IV}, Lisset Evelyn Fuentes Smith^V

^I *Master* en Ciencias en Atención Integral al niño. Doctor en Medicina. Especialista Primer Grado en Medicina General Integral y Genética Clínica. Asistente. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. e.mail: hilda.roblejo@infomed.sld.cu

^{II} Doctor Ciencias Veterinarias. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Titular. e.mail: irosado@infomed.sld.cu

^{III} Licenciado en Biología. Investigador Agregado.

^{IV} Doctor en Ciencias de la Salud. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Titular. e.mail: tcollazo@infomed.sld.cu

^V *Master* en Ciencias en Genética Médica. Licenciada en Matemática. Investigador Agregado. e.mail: evelyn@cngen.sld.cu

RESUMEN

Introducción: el gen CYP2D6 codifica la proteína debrisoquina-4-hidroxilasa, enzima que actúa en la fase I del metabolismo de muchos medicamentos ampliamente usados en la práctica clínica diaria y pertenece a la superfamilia de los citocromos. Hay variantes alélicas que implican una función nula o muy disminuida de esta enzima. La evaluación de cuatro alelos: CYP2D6*3, *4, *5, y *6, predice entre 93–97,5 % de los posibles genotipos metabolizadores lentos, que implican acumulación de concentraciones de derivados tóxicos y por consiguiente mayor riesgo de reacciones adversas.

Objetivo: determinar la frecuencia génica y genotípica asociadas a la variante alélica CYP2D6*6 y compararla con lo reportado en otras poblaciones.

Material y Métodos: se analizaron 183 muestras del banco de ADN del Centro Nacional de Genética Médica, que incluían individuos no relacionados de todo el país. Se estandarizó, en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica, un PCR múltiple para la identificación del alelo.

Resultados: la frecuencia alélica resultó igual a 0,008, resultado que no mostró diferencias significativas con la mayoría de las poblaciones con las que se comparó.

Conclusiones: la distribución de las frecuencias genotípicas observadas, se correspondieron con las esperadas según la Ley de Hardy- Weinberg.

Palabras clave: CYP2D6, farmacogenética, frecuencia alélica, genotipos metabolizadores.

ABSTRACT

Introduction: the CYP2D6 gene codifies the debrisoquine 4-hydroxylase protein, an enzyme involved in the phase I of the metabolism of many drugs widely used in daily clinical practicing and belongs to the superfamily of cytochromes. There are allelic variants that don't involve the action of this enzyme, or at least not in a significative way.

Objective: the evaluation of four alleles: CYP2D6 * 3, * 4, * 5 and * 6 predicts among the 93 to 97.5% of the possible phenotypes poor metabolizers, that involves the accumulation of toxic derivatives and therefore it's increased the risk of adverse reactions.

Material and Methods: 183 samples from the DNA bank of the National Center of Medical Genetics were analysed, including unrelated individuals across the country, in order to determine gene and genotypic frequency associated with the allelic variant CYP2D6 * 6 and compare it with the reported in other populations.

Results: the allelic frequency was 0.008, a result that didn't show a significant difference with most of the comparing population.

Conclusions: the distribution of the observed genotype frequencies was consistent with those expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium law.

Key words: CYP2D6, pharmacogenetics, gene frequency. Genotypes metabolizers.

INTRODUCCIÓN

La comprensión de las bases moleculares de la acción farmacológica o tóxica de los fármacos, así como los factores genéticos que pueden influir en la respuesta de los individuos, permite optimizar el uso de los mismos, en lo que se conoce como medicina personalizada. En la actualidad existe una tendencia mundial al empleo de las herramientas que brinda la farmacogenética, especialmente para medicamentos con un índice terapéutico estrecho y cuya vía metabólica principal involucra una enzima polimórfica.¹⁻³

En humanos, el mejor ejemplo estudiado de polimorfismos genéticos relacionado con enzimas que actúan en la fase I del metabolismo de muchas sustancias endógenas y exógenas, es el gen CYP2D6, localizado en el cromosoma 22 región

22q13.1. Codifica la enzima debrisoquina 4 – hidroxilasa o Citocromo P450 (*CYP2D6*), que cataliza el metabolismo oxidativo de una amplia gama de medicamentos de uso común, tales como algunos antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, entre otros.⁴

En general, se conocen tres fenotipos principales en relación con la respuesta individual a los medicamentos metabolizados por esta enzima: metabolizadores normales, lentos y ultrarrápidos. Los lentos tienen riesgo de acumulación de concentraciones tóxicas, mientras que los ultrarrápidos tienen riesgo de recibir un tratamiento insuficiente, con dosis inadecuadas para el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas del fármaco en el rango terapéutico. De 93 a 97,5% de los fenotipos metabolizadores lentos son producidos por la combinación en el genotipo de cuatro alelos: *CYP2D6**3, *4, *5, y *6.

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia génica y genotípica asociadas a la variante alélica *CYP2D6**6 en una muestra de la población cubana, y compararla con lo reportado en otras poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de corte transversal, en el primer semestre del 2013, en el Centro Nacional de Genética Médica. Se seleccionaron por un muestreo aleatorio simple, 183 muestras del banco de ADN, que incluían individuos no relacionados de todo el país. No se tuvieron en cuenta los datos de identificación, ni el sexo, pues no hay diferencias reportadas en otras poblaciones entre hombres y mujeres. Este estudio se inserta dentro de un proyecto de investigación que fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

Estudio molecular

Para la identificación de la variante alélica *CYP2D6**6 se estandarizó, en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica, un PCR múltiple o *tetra-primer* utilizando la metodología descrita por Hersberger y colaboradores.⁵ En la Tabla 1 se muestra la secuencia de los iniciadores usados.

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio para las reacciones de PCR *tetra-primer*

Iniciador	*Posición 5'	Secuencia	*Posición 3'
1	1388	TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCTG	1409
2	2137	GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT	2114
11	1808	TCCTCGGTCACCCA	1795
Tmut	1782	GTCGCTGGAGCAGG	1795

*Posición con respecto a la secuencia del gen *CYP2D6* humano (GenBank Nº de acceso M33388). La secuencia de los iniciadores se muestra de 5'-3'.

Para la detección del alelo *6, las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 25 L que contenían 1x de solución tampón de la polimerasa, 1 mM de MgCl₂, 0, 2 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada cebador, 2,5 U de Taq ADN Polimerasa y de 50 a 100 ng de ADN genómico.

Las condiciones del PCR múltiple fueron las siguientes: 10 min a 94°C, seguido de 15 ciclos a 94°C por 30 seg, 63°C por 30 seg, y 72°C por 60 seg. En un segundo paso se siguió con 27 ciclos de 94°C por 30 seg, 53°C por 30 seg, y 72°C por 60 seg, con una extensión final a 72°C por 7 min. El producto del PCR se verificó a través de corridas electroforéticas en geles de agarosa al 2 %, a 150 V durante 1h 30 min, teñidos con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

La frecuencia génica del alelo CYP2D6*6 fue calculada a partir de los genotipos observados. Para definir si las frecuencias genotípicas y génicas de la muestra en estudio se encontraban en equilibrio génico de Hardy- Weinberg (H-W) se calculó el Ji cuadrado (x²) de Mantel Haenzel (gl=1) y la prueba exacta de Fisher. Se aplicó el *test* de diferencia de proporciones para la comparación de la frecuencia del alelo CYP2D6*6 con otras poblaciones. El nivel de significación estadístico utilizado fue de α=0,05 y el paquete de análisis estadístico usado fue Statistica Versión 7.0.

RESULTADOS

Se identificaron tres alelos CYP2D6*6 entre los 183 individuos estudiados, lo cual corresponde a una frecuencia génica de 0,008. Al observar la Tabla 2 podemos comparar este resultado con otros estudios realizados en diferentes poblaciones.

Tabla 2. Frecuencia del alelo CYP2D6*6 en diferentes poblaciones ⁶⁻¹²

Poblaciones	N	Frecuencia del alelo (%)	Referencia
Venezuela (región centrooccidental)	100	0,005	Grimán y colaboradores
Chile	40	0,0125	Kramer y colaboradores
España	327	0,031*	Llerena y colaboradores
Colombia	121	0	Isaza y colaboradores
Cubanos blancos	130	0,008	Llerena y colaboradores
Cubanos mestizos	126	0,012	Llerena y colaboradores
Nicaragua	196	0	Llerena y colaboradores
Rusia	290	0,009	Gaikovitch y colaboradores
Italia	360	0,013	Scordo y colaboradores
Francia	514	0,009	Sabbagh y colaboradores

N: número de individuos incluidos en el estudio

* p<0,05

En la muestra estudiada el genotipo más representado fue el homocigótico para el alelo salvaje (Tabla 3). La distribución de las frecuencias genotípicas observadas, se corresponden con las esperadas, según la Ley de Hardy Weinberg.

Tabla 3. Distribución de las frecuencias genotípicas relacionadas con el CYP2D6*6 en una muestra de población cubana, 2013

Genotipo	Número de individuos observados (n=183)	Frecuencia genotípica observada		Frecuencias Absolutas Esperadas (Equilibrio H-W)	Frecuencia genotípica esperada (Equilibrio H-W)	
		Frecuencia	IC (95%)		Frecuencia	IC (95%)
Alelo salvaje/ alelo salvaje	180	0,98	(0,95-0,99)	179	0,98	(0,94-0,99)
Alelo salvaje/ *6	3	0,02	(0,003-0,04)	4	0,02	(0,006-0,05)
*6/*6	0	0	(0,00-0,002)	0	0	(0,00-0,002)

$\chi^2=0,2555$ gl=1 p=0,613169

DISCUSIÓN

La enzima CYP2D6 es crucial en el metabolismo de muchos medicamentos; ahí radica la importancia de su estudio en el campo de la farmacogenética. El gen CYP2D6 que codifica esta enzima es muy polimórfico, se han identificado al menos 50 variantes alélicas.¹³ Las frecuencias de los alelos más frecuentes son diferentes en cada grupo étnico,¹⁴ por lo que resulta esencial determinar la prevalencia de los polimorfismos de CYP2D6 en cada población. En relación con el origen étnico de la población cubana, es importante señalar que las islas del Caribe, incluyendo Cuba, fueron las primeras habitadas por meso-americanos y, más tarde, por amerindios que se plantea, procedían de Venezuela.^{15,16} Los colonizadores españoles caucásicos extinguieron la población amerindia e introdujeron los negros esclavos del Este de África y África subsahariana, por lo que la composición genética de la población cubana, es resultado, fundamentalmente, de la mezcla de españoles caucásicos y negros africanos.¹⁷ En nuestro estudio se analizó una muestra que incluyó individuos de todo el país, sin dividirla en función del color de la piel, porque justamente este mestizaje de la población cubana, hace que en individuos fenotípicamente blancos o negros, aparezcan genes de procedencia caucásica o africana, de modo indistinto.¹⁸ La frecuencia génica resultó igual a la obtenida por Llerena y colaboradores⁸ en el grupo de cubanos blancos (0,008). En este artículo citado, la población cubana fue dividida en dos grupos: cubanos blancos (individuos con los cuatros abuelos de origen caucásico), y cubanos mestizos (el resto que no cumplía esta condición). En el grupo de cubanos mestizos el valor de la frecuencia del alelo fue superior (0,012). Sin embargo, tal como mencionamos, no se puede descartar que en los cubanos blancos, incluidos en la investigación que citamos, haya genes de procedencia africana.

En contraste con el origen étnico de nuestra población, la frecuencia que reportamos en este estudio tiene diferencias estadísticamente significativas con la frecuencia del alelo CYP2D6*6 en la población española estudiada por Llerena y colaboradores.⁸ (p=0,0366)

Hay otras poblaciones citadas en las que no se ha hallado este alelo, tal es el caso de las muestras de nicaragüenses y colombianos estudiadas.^{8,9}

En nuestro caso, la muestra analizada resulta útil como muestra de controles para futuros análisis de asociación alélica, dado que es representativa de la población

general, pues cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg para este alelo. No obstante, es necesario completar el análisis de otras variantes alélicas, tales como *3, *4 y *5 de CYP2D6, que junto con la variante analizada abarcan alrededor de 97 % de los genotipos metabolizadores lentos.

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren otros fenómenos como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar un genotipo depende del producto de las frecuencias de cada alelo.

CONCLUSIONES

La distribución de las frecuencias genotípicas observadas, se correspondieron con las esperadas según la Ley de Hardy-Weinberg. El uso de la genotipificación para determinar la capacidad metabólica de la enzima CYP2D6, y otras enzimas metabolizadoras de fármacos, será una parte integral del cuidado de cada paciente y su manejo terapéutico. La creación de bases de datos donde se registre la capacidad metabolizadora de los individuos frente a los medicamentos de uso común, nos encaminará hacia la era de la Medicina personalizada, facilitando su uso en la práctica clínica, e implicará a su vez una farmacoterapia individualizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gaedigk A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *Int Rev Psychiatry*. 2013 Oct; 25(5): 534-53.
2. Müller DJ, Kekin I, Kao AC, Brandl EJ. Towards the implementation of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in clinical practice: update and report from a pharmacogenetic service clinic. *Int Rev Psychiatry*. 2013 Oct; 25(5): 554-71.
3. Alcázar-González GA, Calderón-Garcidueñas AL, Garza-Rodríguez ML, Rubio-Hernández G, Escorza-Treviño S, Olano-Martín E, Cerda-Flores RM, Castruita-Ávila AL, González-Guerrero JF, le Brun S, Simon-Buela L, Barrera-Saldaña HA. Comparative study of polymorphism frequencies of the CYP2D6, CYP3A5, CYP2C8 and IL-10 genes in Mexican and Spanish women with breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2013 Oct; 14(13): 1583-92.
4. López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005 Nov; 61(10):749-54.
5. Hersberger M, Martí-Jaun J, Rentsch K, Hänseler E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4 and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clinical Chemistry*. 2000; 46(8):1072-77.
6. Grimán P, Morán Y, Camargo M, Chiurillo MA. Caracterización de variantes alélicas de citocromo CYP2D6 en la población de la región centroccidental de Venezuela. *Acta biol Colomb*. 2009;14(1):195-202.

7. Kramer V, Marín JC, Yarur A, Hormazábal M. Variantes alélicas *4 y *6 de citocromo P450 2D6: estudio piloto. *Rev Farmacol Chile*. 2011;4(1): 9.
8. Llerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Calzadilla LR. CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J*. 2012 Apr;12(2):176-83.
9. Isaza CA, Henao J, López AM, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2000; 22:695-705.
10. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke K, et al. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and p-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003; 59(4): 303-312.
11. Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Favava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res*. 2004; 50: 195-200.
12. Sabbagh N, Brice A, Marez D, Dürr A, Legrand M, Lo Guidice JM, et al. CYP2D6 polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Mov Disord*. 1999;14(2):230-236.
13. Sundberg-Ingelman M, Daly AK, Nebert DW, eds. CYP allele nomenclature home page. [Acceso 2014 Ene 13]. Disponible en: <http://www.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm>
14. Sosa-Macías M, Llerena A. Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations. *Drug Metabol Drug Interact*. 2013; 28(4): 193-208.
15. Ustáriz García CR, Morera Barrios LM, Hernández Ramírez P, Estrada del Cueto M, Bencomo Hernández A, García García MA, et al. Origen y composición genética de la población cubana. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [revista en la Internet]. 2011 Sep; 27(3): 273-282. [Citado 2014 Ene 13]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300002&lng=es.
16. Ulloa J. Archaeology and Rescue of the Aboriginal Presence in Cuba and the Caribbean. *KACIKE: The urnal of Caribbean Amerindian History and Anthropology*. 2002.
17. Alegre R, Moscoso J, Martínez-Laso J, Martín-Villa M, Suárez J, Moreno A, et al. HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol*. 2006; 44(9): 2426-35.
18. Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschøn HN, et al. (2014) Cuba: Exploring the History of Admixture and the Genetic Basis of Pigmentation Using Autosomal and Uniparental Markers. *PLoS Genet*. 2014; 10(7): 1004-488.

Recibido: 31 de marzo de 2014

Aprobado: 12 de noviembre de 2014
