

# Diseño y Desarrollo de un Programa de Farmacogenética en Antipsicóticos Enfocado al Tratamiento de la Esquizofrenia.

Traslación a la Práctica Clínica de la Información Farmacogenética.

Alejandro Gesteira Ponce



Directores:

Dr. Ángel M<sup>a</sup> Carracedo Álvarez

Dr. Francisco Barros Angueira

Dr. Francisco Barros Angueira

Dr. Ángel M<sup>a</sup> Carracedo Álvarez



Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía Patológica y CC. Forenses



DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE  
FARMACOGENÉTICA EN ANTIPSICÓTICOS ENFOCADO AL  
TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA. TRASLACIÓN A LA  
PRÁCTICA CLÍNICA DE LA INFORMACIÓN FARMACOGENÉTICA.

Memoria presentada para optar al grado de doctor  
Alejandro Gesteira Ponce  
Santiago de Compostela, 2007



El Doctor *D. Ángel Carracedo Álvarez*, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y el Doctor *D. Francisco Barros Angueira*,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, “DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE FARMACOGENÉTICA EN ANTIPSICÓTICOS ENFOCADO AL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA. TRASLACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA DE LA INFORMACIÓN FARMACOGENÉTICA” del licenciado en Biología D. Alejandro Gesteira Ponce, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el departamento de Anatomía patológica y CC. Forenses, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expedimos este certificado en Santiago de Compostela a 12 de Septiembre de 2007.

Fdo: Prof. Dr. Ángel M<sup>a</sup> Carracedo Álvarez      Fdo. Dr. Francisco Barros Angueira



## DEDICATORIA

A mi madre, la parte científica de mi familia, por sus consejos, apoyo, y conocimientos en el área de la salud mental.

A mi padre, la parte artística y creativa de mi familia, que me ha servido tanto o más que la parte científica.

A mi hermana, por soportar largas parrafadas, en mis años de universitario y de doctorado.

A Pili, por aportarme la constancia que me falta.

A mis amigos, que siempre han estado ahí.

*“La ciencia no nos ha enseñado aún si la locura es o no lo más sublime de la inteligencia”.*

Edgard Allan Poe (1809-1849)



## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la elaboración de esta tesis.

A Pancho por sus consejos, su experiencia y su modo de entender la ciencia.

A Ángel por haber apostado por la investigación y en especial por la Farmacogenética.

Al equipo de Roche Diagnostics su implicación con este trabajo y su ayuda al dejarnos acceder al Amplichip P450, en especial a Teresa Ramos y Laia Mayo.

Al laboratorio de Progénika que se encargó de parte del genotipado del Amplichip.

Al Servicio de Psiquiatría del Complejo Hospitalario de Ourense: Alcira Cibera, Fernanda Iglesias y Estefanía Pumar. Sin su difícil trabajo nada de esto hubiese sido posible.

Al equipo de Farmacogenética de Brasil Fabiana Barzotti Kohlrausch y Mara H. Hutz, Paulo Belmonte de Abreu, Clarissa Gama, Maria Inês Lobato.

Al grupo de investigación Biofarma de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, especialmente a Eduardo Dominguez y Mabel Loza por su colaboración.

Al equipo del nodo CEGEN de Santiago: María Torres, Inés, Bea Sobrino, Chris Phillips, Jorge Amigo y Xavi Costas.

A Pablo Raña, compañero en el grupo de Farmacogenética de la Unidad, por su apoyo, su bibliografía y algunas horas de termociclador.

A mis compañeros de la Unidad de Medicina Molecular y el departamento de Medicina Legal: Ana Vega, Ana Blanco, Clara, Nuria, Celsa, Mili, Ceres, Ana Fernández, Silvia, Luli, Rocío, Marga, Marta, María de la Fuente, Susi, Bea Quintáns, Galo, Carla, Menchu, Pili, Vanesa y Toño.



GLOSARIO, ABREVIATURAS Y TÉRMINOS EN INGLÉS.....	17
CAPÍTULO I: OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN.....	25
1. ¿QUÉ ES LA FARMACOGENÉTICA?.....	25
2. ¿POR QUÉ ES NECESARIA LA FARMACOGENÉTICA?.....	26
3. CONDICIONES NECESARIAS PARA UN ESTUDIO FARMACOGENÉTICO.....	26
Consideraciones que definen la idoneidad de un estudio Farmacogenético:.....	29
3.1 Propias del tratamiento y la enfermedad.....	29
3.2 Económicas.....	29
3.3 Técnicas.....	29
3.4 Sociales.....	30
4. LA ESQUIZOFRENIA.....	31
4.1 ¿Qué es?.....	31
4.2 Síntomas.....	32
4.3 Diagnóstico.....	32
4.4 Genética.....	33
4.5 Etiología y tratamiento.....	33
4.5.1 HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA:.....	34
4.5.2 HIPÓTESIS SEROTONINÉRGICA-DOPAMINÉRGICA.....	37
5. IMPACTO DE LA FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA.....	40
5.1 En el campo de la enfermedad y su tratamiento:.....	40
5.2 En el campo económico:.....	42
5.3 En el campo social:.....	43
5.4 En el campo técnico:.....	43
6. ESTADO DEL CONOCIMIENTO SOBRE LOS GENES IMPLICADOS EN LA FARMACOGENÉTICA DEL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA:.....	44
6.1 GENES DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT <sub>2</sub> .....	44
6.1.1 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT <sub>2C</sub> (HT <sub>2R2C</sub> ) Y SU VARIANTE CYS 23 SER.....	44

6.1.2 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT <sub>2A</sub> (HTR <sub>2A</sub> ) Y SUS VARIANTES 102C/T E HIS452TYR.....	46
a) HIS452TYR.....	46
b) 102C/T.....	47
6.2 GEN DEL RECEPTOR DE HISTAMINA H <sub>2</sub> Y SU VARIANTE -1018 G>A.....	48
6.3 CITOCROMOS P450:.....	49
6.3.1 GEN DEL CITOCROMO P450 1A2 (CYP1A2):.....	53
6.3.2 GEN DEL CITOCROMO P450 2D6 (CYP2D6):.....	55
6.3.3 GENES DE LA FAMILIA DEL CITOCROMO P450 3A (CYP3A): CYP3A4 Y CYP3A5.....	61
a) CYP3A4.....	61
b) CYP3A5.....	62
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. ANÁLISIS DE CYP2D6 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA.....	67
1.1 Amplificación por PCR del gen completo:.....	68
1.2 PCR de los fragmentos de interés:.....	69
1.3 Secuenciación de los fragmentos de interés (C1, C2, C3, C4, SNP1 y SNP2):	71
1.3.1 Comprobación de la PCR.....	71
1.3.3 Secuenciación del producto purificado.....	71
1.3.4 Purificación del producto de secuenciación:.....	72
1.3.5 Lectura de secuencias:.....	73
2. DETECCIÓN DE LA DUPLICACIÓN Y DELECIÓN GÉNICA.....	75
3. GENOTIPADO DE CYP2D6 MEDIANTE AMPLICHIP P450:.....	76
3.1 Obtención de DNA a partir de sangre total:.....	77
3.2 Amplificación por PCR.....	77
3.3 Fragmentación y Marcado de los productos de PCR.....	79
3.4 Hibridación y Tinción del array.....	79
3.5 Lectura del microarray.....	80
3.6 Determinación de los genotipos y fenotipos predichos.....	80
4. GENOTIPADO DE CYP1A2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN.....	81

5. GENOTIPADO DE CYP3A4 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA	83
6. GENOTIPADO DE CYP3A5 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA	84
7. GENOTIPADO DE HTR2A, HTR2C y H2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA.....	85
8. GENOTIPADO MEDIANTE SNaPshot®.....	87
8.1 Desarrollo de los diseños de SNaPshot®.....	87
8.2. Amplificación de fragmentos elegidos por PCR Multiplex.....	88
8.3. Purificación de los productos de PCR.....	89
8.4. Reacción de SNaPshot® tm.....	90
8.5. Análisis de las sondas extendidas por electroforesis:.....	91
9. GENOTIPADO POR SEQUENOM®:.....	91
9.1 Búsqueda de SNPs o variantes polimórficas de interés:.....	91
9.1.1 CYP2D6.....	91
9.1.2 Otros genes:.....	93
9.2 Desarrollo y comprobación de los diseños para Sequenom®.....	94
9.2.1 Aproximaciones para la detección de dosis de CYP2D6.....	94
9.2.2 Ensayos (reacciones de PCR multiplex realizadas en un mismo pocillo):.....	95
9.3 Preparación de las muestras:.....	96
9.3.1 PREAMPLIFICACIÓN DE CYP2D6.....	96
9.3.2 PREPARACIÓN DE PLACAS:.....	98
9.4 Amplificación de Fragmentos por PCR Multiplex:.....	98
9.5 Reacción de extensión de una sola base a partir de la sonda (iPlex):.....	98
9.6 Análisis de la sonda extendida mediante MALDI-TOF-MS.....	99
9.7 Interpretación de los resultados: programa de análisis.....	100
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
1. DESARROLLO Y ELECCIÓN DE UN MÉTODO DE GENOTIPADO ÚTIL PARA SU USO EN FARMACOGENÉTICA.....	104
1.1 MÉTODOS DE BAJA CAPACIDAD:.....	106
1.1.1 SECUENCIACIÓN DE CYP2D6.....	106
PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	108

1.1.2 DETECCIÓN DE LA DUPLICACIÓN Y DELECIÓN GÉNICA POR PCR.....	109
PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	110
1.1.3 GENOTIPADO DE CYP2D6 MEDIANTE AMPLICHIP P450.....	111
PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	112
1.1.4 GENOTIPADO DE CYP1A2 POR SECUENCIACIÓN.....	115
PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	116
1.1.5 GENOTIPADO POR SNaPshot®.....	117
PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	118
1.2 MÉTODOS DE ALTA CAPACIDAD: SEQUENOM®.....	119
1.2.1 Aproximación a dosis de CYP2D6:.....	123
a) Comparación de las áreas de los picos en SNPs de CYP2D6 en heterocigosis:.....	123
c) Comparación de áreas de picos de posiciones no polimórficas de CYP2D6 y posiciones no polimórficas de otros genes.....	125
1.2.2 Automatización del Análisis de Datos:.....	126
1.2.3 PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:.....	127
2. ELABORACIÓN DE UNA TABLA DE PREDICCIONES:.....	129
2.1 PREDICCIONES PARCIALES.....	131
2.1.1 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT <sub>2C</sub> (HT <sub>2R2C</sub> ) Y SU VARIANTE CYS 23 SER.....	131
2.1.2 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT <sub>2A</sub> (HTR <sub>2A</sub> ) Y SU VARIANTE HIS452TYR.....	132
2.1.3 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT <sub>2A</sub> (HTR <sub>2A</sub> ) Y SU VARIANTE 102C/T.....	132
2.1.4 GEN DEL RECEPTOR DE HISTAMINA H <sub>2</sub> Y SU VARIANTE -1018 G>A.....	133
2.1.5 GEN CYP1A2 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.....	133
a) ALELO *1F.....	133
b) ALELOS *1C, *1K, *7 Y *11.....	133
2.1.6 GEN CYP3A4 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.....	134
2.1.7 GEN CYP3A5 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.....	134
2.1.7 GEN CYP2D6 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.....	135

2.2 PREDICCIONES GLOBALES POR MEDICAMENTO.....	136
3. APLICACIÓN DEL PROGRAMA.....	138
3.1 APLICACIÓN EN EL ESTUDIO PILOTO DE FARMACOGENÉTICA DE ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS EN PACIENTES DEL ÁREA SANITARIA DE OURENSE.....	138
3.1.1 Fundamentos del estudio.....	138
3.1.2 Genotipado: Métodos de utilizados y resultados.....	142
a) RESULTADOS AMPLICHIP P450:.....	143
b) RESULTADOS SNaPshot®:.....	145
b.1) CYP1A2.....	146
b.2) CYP3A4-CYP3A5:.....	147
b.3) H2:.....	148
b.4) 5HT2A (HTR2A):.....	148
b.5) 5HT2C (HTR2C):.....	148
c) RESULTADOS DE SEQUENOM®.....	149
3.1.3 Aplicación de la tabla de predicciones en la muestra del estudio.....	149
3.2 APLICACIÓN DEL PROGRAMA AL PROYECTO "Estudios farmacogenéticos de la respuesta al tratamiento con antipsicóticos en esquizofrénicos del sur de Brasil".....	154
3.2.1 Fundamentos del Estudio.....	154
3.2.2 Genotipado: Métodos de utilizados y resultados.....	154
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	168
ANEXOS.....	185



## GLOSARIO, ABREVIATURAS Y TÉRMINOS EN INGLÉS

A: Adenina

ADR: *Adverse Drug Reaction* (Reacción Adversa a Fármacos)

bp: *Base Pair* (pares de bases)

C: Citosina

CYP: Citocromo P450

Cys/C: Cisteina

dNTP: Deoxinucleótido Trifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EM: *Extensive Metabolizer* (Metabolizador Extensivo)

et al.: y colaboradores

F: *Forward* (Primer “hacia delante”)

FDA: *Federal Drug Administration*

G: Guanina

His: Histidina

ICH: *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (Conferencia Internacional para la Armonización de los Requerimientos Técnicos para el Registro Farmacéutico de uso Humano)

IM: *Intermedium Metabolizer* (Metabolizador Intermedio)

Kb: Kilobase (1000 bp)

Leu /L: Leucina

min: Minuto

mM: MiliMolar

Multiplex: PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en la misma reacción.

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la Polimerasa)

PGx: Farmacogenómica

Phe/F: Fenilalanina

PM: *Poor Metabolizer* (Pobre Metabolizador)

*Primer*: Término en inglés que define al Oligonucleótido Cebador usado durante la polimerización.

Pro/P: Prolina

R: *Reverse* (*Primer* reverso)

REP: Reacción Extra-Piramidal

RFLPs: *Restriction Fragments Length Polymorphism* (Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de restricción)

rpm: Revoluciones por Minuto

Ser/S: Serina

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de un sólo nucleótido)

T: Timina

TM: Temperatura de *Melting*

Tyr: Tirosina

UM: *Ultra-rapid Metabolizer* (Metabolizador Ultrarápido)

μl: Microlitro

## OBJETIVOS



## CAPÍTULO I: OBJETIVOS

1. Desarrollo de un método diagnóstico de marcadores farmacogenéticos implicados en la respuesta a los antipsicóticos.

1.1. Identificación y caracterización de marcadores de utilidad y relevancia farmacogenética en el campo del tratamiento con antipsicóticos en pacientes diagnosticados con esquizofrenia.

1.2. Desarrollo e implementación de una técnica de genotipado robusta, rápida y válida para un elevado número de muestras, enfocada a su utilización en el contexto clínico.

2. Establecimiento de las pautas de utilización de dichos marcadores farmacogenéticos a la hora de modificar los tratamientos antipsicóticos.

3. Evaluación del método diagnóstico y sus pautas de utilización en una población de pacientes con tratamiento antipsicótico.



## INTRODUCCIÓN



## CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN

### 1. ¿QUÉ ES LA FARMACOGENÉTICA?

La Farmacogenética (PGt) se define actualmente como “*La influencia de las variaciones en la secuencia del DNA sobre la respuesta a fármacos*”. Este concepto se diferencia de un concepto más amplio, el de la Farmacogenómica (PGx), definida como “*La investigación de las características de las variaciones del DNA y el RNA en relación con la respuesta a fármacos*”. Ambos conceptos han sido históricamente confundidos, pero según esta definición consensuada por la ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, 2006*), la Farmacogenética pasaría así a representar un subapartado dentro de la Farmacogenómica.

El término Farmacogenética fue acuñado por Fredrich Vogel en 1959, que la definió como “*Variación hereditaria de importancia clínica en la respuesta a los fármacos*”, pero la idea es bastante anterior: en 1902 Sir Archibald Edward Garrod (responsable de la hipótesis “*Un gen un enzima*”) sentaría las bases de la Farmacogenética con el estudio en el que se basa su artículo “*The Incidence of Alkaptonuria: a Study in Chemical Individuality*” (Garrod, 1902), donde ya postulaba que variaciones genéticas podrían causar diferencias interindividuales en el metabolismo de los alcaptonos. Garrod se dio cuenta de que existían patrones familiares en la enfermedad conocida como Alkaptonuria, y que ésta debía estar causada por la modificación o fallo de un enzima metabólico responsable de la degradación de los alcaptonos, lo cual causaba el oscurecimiento de la orina característico de esta afección.

En 1957, Arno G. Motulsky demostraría la asociación entre efectos secundarios y variaciones genéticas y en 1960 Evans publica un estudio en el que relaciona polimorfismos genéticos (determinados por estudios de familias) con el metabolismo de medicamentos (Evans et al., 1960), pero fue en 1962 cuando Werner Kalow sentó las bases de la Farmacogenética como ciencia con su artículo “*Pharmacogenetics: Heredity and Response to Drugs*” (Kalow, 1962) .

En 1970 se identificaron los primeros polimorfismos de un gen implicado en el metabolismo de fármacos: CYP2D6 y fue en 1977 cuando Mahgoub et al descubrieron, en un estudio pionero (Mahgoub et al., 1977), que estos polimorfismos estaban relacionados con el desarrollo de efectos secundarios a la debrisoquina, un antihipertensivo comúnmente utilizado, en pacientes sanos.

## 2. ¿POR QUÉ ES NECESARIA LA FARMACOGENÉTICA?

Al margen del lógico interés científico, la Farmacogenética es una disciplina cuya finalidad es claramente clínica, frente a la Farmacogenómica, que tendría una aplicación más ligada a detectar nuevas dianas de interés terapéutico. Podríamos decir que la Farmacogenómica, como rama más extensa, se enfoca a determinar cuáles son los mecanismos por los que un fármaco funciona basándose en el descubrimiento de sus bases genéticas, mientras que la Farmacogenética tendría una aplicación más directa: distinguir aquellos pacientes que se pueden beneficiar de un tratamiento ya existente, aquellos que no responderán a dicho tratamiento o aquellos que presentarán reacciones adversas, de forma previa a su administración.

## 3. CONDICIONES NECESARIAS PARA UN ESTUDIO FARMACOGENÉTICO

La existencia de variaciones en la respuesta a un fármaco es un concepto que trasciende el ámbito médico: de forma cotidiana se habla de la falta de respuesta a ciertos fármacos como algo habitual y aceptado. Hay a quien el paracetamol parece no aliviarle el dolor de cabeza, mientras que a otras personas les funciona perfectamente, al igual que hay a quien el café le produce un intenso efecto excitatorio, mientras a otros parece no causarles efecto alguno. Incluso somos conscientes, en muchos casos, de qué dosis nos viene mejor para según qué medicamento. Este conocimiento es resultado de un sistema de ensayo-error a nivel personal, mediante el cual vamos determinando cuál es nuestra respuesta a algunos fármacos. Para la mayoría de los fármacos recurrimos, sin embargo al consejo de un facultativo, que se basará en su experiencia y en las guías clínicas de los medicamentos, que determinan cuáles son las dosis óptimas para cada medicamento en función de los síntomas, dosis que se establecen de forma empírica en estudios previos, basados en una población determinada y casi siempre en monoterapia. En el caso de que el tratamiento no tenga efecto o aparezcan efectos adversos el facultativo cambiará de medicamento o ajustará la dosis. Se trata, de nuevo, de un sistema de ensayo-error, aplicado a una escala mucho mayor. Este sistema se ve enriquecido con el gran número de pacientes tratados con cada fármaco, lo que incrementa las posibilidades de éxito en la elección de tratamiento y dosis. De hecho, para muchos medicamentos las dosis estándar son perfectamente válidas para la mayor parte de los pacientes.

En Farmacología el término  $ED_{50}$  determina cuál es la dosis de un medicamento que causa efecto al 50% de una población. Este término, definido por Trevan et Al en 1927 y ampliamente extendido en la farmacología, implica “per se” la existencia de variaciones interindividuales en la respuesta a los fármacos. Estas variaciones pueden ser mayores o menores dependiendo de la naturaleza del medicamento en cuestión y suele trabajarse en un rango de dosis para muchos de ellos, en lugar de una dosis fija.

El término “Ventana Terapéutica” se utiliza como el rango de dosis efectiva, por debajo de la cual no existe respuesta y por encima de la cual pueden aparecer efectos adversos provocados por un exceso de medicamento. Existen fármacos que poseen una ventana terapéutica “ancha”, de forma que producen respuesta con rangos de dosis muy amplios, siendo necesario elevar mucho la cantidad administrada para provocar efectos adversos. Otros sin embargo, de ventana terapéutica “estrecha”, requieren afinar mucho la dosis, ya que un pequeño incremento sobre la dosis óptima hace que el paciente muestre reacciones adversas y una leve disminución provoca el fallo del tratamiento por falta de respuesta (ver *Figura 1*).

El método ensayo-error es un buen método en aquellas sustancias con una ventana terapéutica ancha, porque el riesgo de fallo de tratamiento no depende en exceso de la habilidad para determinar la dosis óptima, sin embargo se acepta como un mal difícilmente evitable en los que tienen una ventana terapéutica estrecha. En estos casos, se va afinando poco a poco la dosis hasta lograr la respuesta deseada, proceso que puede demorar muchísimo la aparición de la misma.

Otro factor a tener en cuenta es la gravedad de los efectos adversos inducidos por un exceso de dosis. Para muchos fármacos, una dosis superior a la terapéutica constituye un riesgo menor fácilmente asumible, debido a que las reacciones provocadas presentan una gravedad despreciable. También puede ocurrir que la gravedad de la reacción adversa sea, en todo caso, menor que el beneficio obtenido por el tratamiento. Esto ocurre, por ejemplo con los quimioterápicos, cuyo uso terapéutico compensa, pese a presentar unos terribles efectos secundarios (que pueden llegar a ser mortales). En otros casos los efectos adversos superan en gravedad a los beneficios del tratamiento, aún en un grupo reducido de pacientes, y, pese a ello, se continúa con su utilización generalmente por la carencia de un tratamiento más efectivo o con menos riesgos. Esto ocurre con el antipsicótico

## Concepto de Ventana Terapéutica

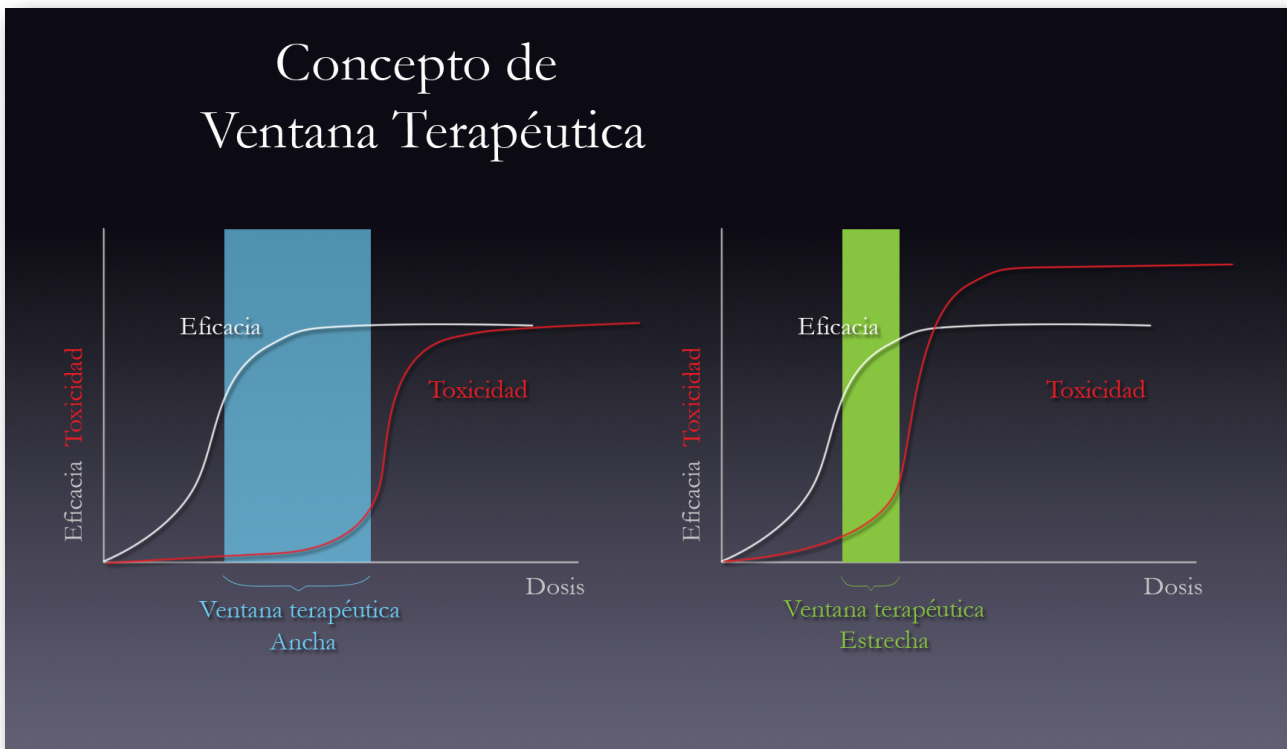


Figura 1: Concepto de Ventana terapéutica. A la izquierda ventana terapéutica “ancha”, a la derecha ventana terapéutica “estrecha”. El rango de dosis óptima está resaltado en azul y verde.

atípico por excelencia, la Clozapina, cuyo uso está restringido habitualmente a aquellos pacientes que no responden a otros tratamientos antipsicóticos. La Clozapina ha demostrado ser el fármaco más efectivo en el tratamiento de las esquizofrenias resistentes, pero puede producir toxicidad sobre la médula ósea provocando agranulocitosis con una incidencia del 1-2% en el primer año de tratamiento, y que puede resultar fatal en el 32% de los casos, con lo cual se realiza una monitorización exhaustiva paralelamente a su administración.

La Farmacogenética, como disciplina aplicada, pretende, si no eliminar el método ensayo-error, si ser una herramienta útil en aquellos casos en los que los riesgos del tratamiento, bien por que su ventana terapéutica sea estrecha, bien porque los efectos adversos sean relevantes. Se trataría de predecir la respuesta y el riesgo de desarrollar efectos adversos ante un tratamiento determinado antes de administrarlo, con lo cual se evitaría el riesgo para el paciente y se disminuiría el tiempo de detección de la terapia y dosis óptimas.

Lógicamente no todos los medicamentos son susceptibles de la realización de un estudio farmacogenético, sino que existen una serie de valoraciones a tener en cuenta.

## Consideraciones que definen la idoneidad de un estudio Farmacogenético:

### 3.1 Propias del tratamiento y la enfermedad.

Evidentemente serán más interesantes, desde el punto de vista farmacogenético, aquellos fármacos cuyo efecto terapéutico contribuya notablemente a la mejoría de un paciente con una dolencia grave, incapacitante o problemática. Si bien se pueden realizar estudios de este tipo sobre la acción del paracetamol sobre el dolor de cabeza leve, no parece el objetivo más idóneo de la farmacogenética. Además hay que tener en cuenta la prevalencia de la enfermedad, la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, cuál es su ventana terapéutica, etc.

### 3.2 Económicas.

Como en todo intento de introducción de una nueva disciplina y nuevos métodos a nivel clínico, suele exigirse cierto beneficio tanto económico como no económico, lo que se conoce como coste-efectividad. El que el análisis farmacogenético sea coste-efectivo dependerá en gran medida de factores económicos como el coste del tratamiento, el coste económico del fracaso del tratamiento (bien sea por falta de respuesta, bien sea por reacciones adversas) y el coste del estudio farmacogenético. Esta última parte dependerá en gran medida de la disponibilidad y capacidad tecnológica disponible.

### 3.3 Técnicas.

La aplicación de la farmacogenética en la clínica sería totalmente impensable unos cuantos años atrás, debido a que el nivel de conocimiento no era suficiente y a que la tecnología disponible en aquellos momentos no lo permitía.

Un test farmacogenético debe estar sustentado sobre un conocimiento amplio y profundo tanto del tratamiento y su mecanismo de acción-eliminación como de los mecanismos moleculares que determinan la variabilidad en la respuesta al mismo. La revolución de la farmacogenética en estos últimos años ha resultado enormemente beneficiada por la conclusión del Proyecto del Genoma Humano entre 2001 y 2003, así como de la gran cantidad de estudios farmacogenómicos realizados (Ingelman-Sundberg et al., 2005).

Por otro lado debe disponerse de la tecnología necesaria para poder efectuar este tipo de pruebas con fiabilidad, técnicas robustas, de alta sensibilidad y especificidad, que permitan realizar un análisis coste-efectivo en un período de tiempo tal que no suponga un retraso excesivo para el inicio del tratamiento y por tanto un trauma para el paciente y que permita, por otro lado, obtener de él la información necesaria para el clínico. Hasta hace unos años las técnicas dominantes (análisis de fragmentos de restricción, secuenciación directa, etc.) no permitían la introducción de este tipo de test como una prueba rutinaria más. En la actualidad ya se dispone de técnicas de genotipado rápidas, sensibles, y altamente coste-efectivas, como (SNaPshot®, SNPlex®, Sequenom®, etc...) e incluso de técnicas homologadas para su uso aplicado a la clínica, como el Amplichip P450 de Roche, enfocado totalmente a la farmacogenética. Se pueden analizar de cientos a miles de variables polimórficas en un tiempo que sería impensable hace unos cuantos años.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de la utilización de este tipo de test es la existencia de alternativas terapéuticas al tratamiento estudiado. Para que un informe farmacogenético sea realmente útil deben existir otras terapias de elección. El informar a un paciente de que no va a responder a un tratamiento pierde valor si no existe un tratamiento alternativo.

### 3.4 Sociales.

Existen enfermedades con un marcado efecto social, enfermedades altamente incapacitantes como las demencias o las enfermedades mentales, de alta penetrancia o riesgo como las dolencias cardíacas, o el cáncer. En muchos de estos casos la parte económica del coste-efectividad de una prueba como puede ser la farmacogenética pierde importancia en favor del beneficio de su aplicación. Existe en toda enfermedad un coste social que es difícilmente mensurable, pero que debe ser tenido en cuenta a la hora de decidir la implementación de un test farmacogenético.

Así pues las condiciones ideales que debe cumplir una enfermedad para ser susceptible a un estudio farmacogenético serían que se tratase de una enfermedad frecuente, de carácter grave, cuyo coste, tanto económico como social, se pueda ver mejorado con la aplicación de un protocolo de este tipo y sobre la cuál exista un grado de conocimiento suficiente y marcadores de probada importancia farmacogenética. Los avances farmacogenéticos se han venido realizando básicamente en varios campos de enfermedades que se adaptarían a este modelo, como las hematológicas (Warfarina), el cáncer (Irinotecan, 5-Fluorouracilo, Tamoxifeno etc...), las patologías cardíacas (Estatinas), el asma ( $\beta$ -Agonistas) o las enfermedades mentales (antipsicóticos y antidepresivos). De entre estos grupos de enfermedades existe

uno que cumple con creces todas las condiciones: el de las patologías psicóticas y más concretamente la Esquizofrenia.

## 4. LA ESQUIZOFRENIA

### 4.1 ¿Qué es?.

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica grave e incapacitante que se supone afecta alrededor del 1% de la población mundial (según la media aritmética). Las estimaciones según la mediana indican que aproximadamente 8 personas de cada 1000 (Saha et al., 2005) desarrollarán esquizofrenia a lo largo de su vida, 7 de cada 1000 en España (Haro et al., 2003). Se trata de una dolencia que aparece con casi idéntica frecuencia en todas las poblaciones, afectando por igual a hombres y a mujeres (aunque hay estudios que detectan una prevalencia mayor en varones), pese a que la edad de aparición parece ser más temprana en los hombres (entre los 16 y los 24 años) que en las mujeres (entre los 20 y los 34 años).

Pese a que la esquizofrenia como tal es un concepto bastante reciente, se posee constancia de individuos con síntomas psicóticos en el antiguo Egipto (ya existen referencias en el Papiro de Ebers, uno de los tratados más antiguos de medicina) y son comunes sus referencias en textos Griegos y Romanos.

El término Esquizofrenia, que significa literalmente “mente dividida” (del griego Schizos: división y Phrenos: mente), fue propuesto por Eugen Bleuler en 1908 como referencia a la desorganización de los procesos mentales naturales y a la falta de coordinación entre sentimientos y pensamientos detectada en los pacientes. La primera aproximación a la esquizofrenia, la realizó, sin embargo Emil Kraepelin en 1887, que tras la observación de síntomas similares a los de la demencia en individuos jóvenes acuñó el término “*Dementia Praecox*” (demencia precoz), término con el que Bleuler no estaba de acuerdo puesto que los mismos síntomas se habían identificado en individuos adultos y además no implicaba un deterioro progresivo de las funciones mentales, sino más bien una falta de integración de los mismos. Bleuler destacó dos tipos de síntomas: los fundamentales, presentes en todos los individuos (Autismo, Aplanamiento afectivo, Ambivalencia y Asociaciones laxas del pensamiento, lo que se conoce como “las 4 Aes”) y los accesorios (delirios, alucinaciones, conducta catatónica, distorsión del lenguaje etc.). En la actualidad la división de síntomas es bastante similar.

## 4.2 Síntomas.

La esquizofrenia es, más que una enfermedad, una entidad definida por un conjunto de síntomas, un síndrome, de forma que no todos los pacientes esquizofrénicos presentan la misma sintomatología. Además existen muchos trastornos mentales que poseen síntomas solapantes con ella y en ciertos casos su diagnóstico es difícil.

Los síntomas de la esquizofrenia se dividen clásicamente en **positivos** (que se manifiestan como un exceso con respecto a la conducta o función normal) y **negativos** (que suponen una ausencia o pérdida con respecto a la conducta normal). Los **síntomas positivos** más frecuentes son los delirios, las alucinaciones (auditivas, olfativas e incluso visuales), el lenguaje desorganizado, el pensamiento desorganizado, la agitación, la conducta catatónica o la distorsión del lenguaje. Aunque suelen ser las alucinaciones y los delirios los que más llaman la atención, estos no están presentes en todos los esquizofrénicos, sino en una minoría (lo cual da validez a la clasificación propuesta por Bleuler) y es el pensamiento desorganizado el síntoma más característico de la esquizofrenia. Los **síntomas negativos** son los que aparecen con mayor frecuencia en otras enfermedades mentales y trastornos neurológicos y suelen implicar una falta de integración social del paciente esquizofrénico. Coinciden básicamente con los síntomas accesorios de Bleuler. Los más importantes son el aplanamiento afectivo (expresión emocional limitada), anhedonia (dificultad en encontrar placer), abulia (falta de voluntad y persistencia), alogia (dificultades en la integración pensamiento-lenguaje) y Atención deteriorada. También pueden sufrir de pensamientos estereotipados, falta de espontaneidad y retraimiento social. No todos los síntomas aparecen siempre, y existen pacientes con predominio de los síntomas positivos y pacientes con predominio de los negativos; es más, es muy posible que los pacientes tengan predominio de unos síntomas en unas etapas de su vida y de otros en otras. Finalmente la esquizofrenia cronicada y con un tratamiento poco eficaz suele desencadenar, con el paso del tiempo, un deterioro cognitivo que puede llegar a ser muy grave.

## 4.3 Diagnóstico.

El diagnóstico de la esquizofrenia está basado en la observación y evaluación del paciente, tal y como ocurre en otras enfermedades mentales. Aunque existen distintos criterios clínicos, los más extendidos son el CIE de la OMS en su versión 10 y el DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) de la Asociación Americana de Psiquiatría, en su versión IV. En la actualidad el DSM-IV es el criterio más extendido en España, pero en ciertos casos puede ser necesaria la utilización

del CIE u otros. El DSM-IV basa el diagnóstico en la aparición de dos o más de los siguientes síntomas: alucinaciones, comportamiento desorganizado, delirios, pensamiento desorganizado, y síntomas negativos. Estos dos síntomas deben persistir durante, al menos, un período de 1 mes, y deben presentarse de forma continuada alteraciones ligadas a esquizofrenia durante un mínimo de 6 meses. Además deberán existir alteraciones en la actividad social y personal del paciente (trabajo, relaciones sociales, cuidado personal, etc.). También deberán descartarse los trastornos esquizoafectivos, trastornos de la conducta, trastornos del desarrollo (desorden autista, etc.) y las psicosis inducidas por sustancias psicoactivas.

La clasificación DSM diferencia así según sus síntomas cinco tipos de esquizofrenia: esquizofrenia paranoide, esquizofrenia desorganizada, esquizofrenia catatónica, esquizofrenia indiferenciada y esquizofrenia residual.

#### 4.4 Genética.

Está aceptado actualmente que la esquizofrenia es una enfermedad de origen biológico y hereditaria: los estudios clásicos de adopción que Kety y colaboradores realizaron en la década de los setenta demostraban que existía una incidencia mayor de la esquizofrenia entre individuos emparentados biológicamente aunque hubiesen sido criados en familias diferentes (Kety et al., 1976; 1978). Este hecho está confirmado con numerosos estudios con gemelos monocigóticos: se ha estimado que la tasa de concordancia (ambos hermanos poseen el mismo diagnóstico de esquizofrenia) es mucho mayor en gemelos monocigóticos, cerca del 50%, que en gemelos dicigóticos, un 4%. Estos estudios evidenciaron la heredabilidad de la esquizofrenia, pero también pusieron de manifiesto la enorme importancia del ambiente en esta enfermedad, ya que la concordancia en gemelos monocigóticos, genéticamente idénticos está lejos de llegar al 100% que cabría esperar de tratarse de una enfermedad puramente genética. Así parece que todo apunta a algún tipo de susceptibilidad hereditaria a algún factor desencadenante, ya sea físico (se han postulado como factores de riesgo infecciones víricas en la infancia, ciertas condiciones prenatales, consumo de drogas/alcohol e incluso el lugar y estación de nacimiento) ya sea psicológico (estrés, situaciones traumáticas, etc.) (Sullivan, 2005).

#### 4.5 Etiología y tratamiento.

El desarrollo de los tratamientos para la mayor parte de los trastornos se realiza una vez son conocidas las causas fisiológicas del mismo, sin embargo esto no ocurre con la esquizofrenia. Llama la atención que en este caso el tratamiento apareció mucho antes de que hubiese un conocimiento siquiera básico de las causas de la enfermedad; es más, fue la aparición de los primeros tratamientos lo que propició to-

da una suerte de hipótesis sobre los principios fisiológicos de la esquizofrenia. Realmente podría decirse que en la actualidad aún no se conocen las causas totalmente, pese a que existen numerosos estudios y aproximaciones.

El descubrimiento de los fármacos posteriormente conocidos como antipsicóticos ocurrió, como en otros casos, de forma accidental. En los años 50 un cirujano llamado Henri Laborit descubrió un interesante efecto secundario de un antihistamínico (que se venían utilizando para el tratamiento de procesos alérgicos) mientras realizaba un estudio sobre sus efectos en el shock quirúrgico: la Prometacina reducía la ansiedad de los pacientes sin generar confusión. Este descubrimiento inició la búsqueda de otras sustancias, también antihistamínicos, que compartiesen esta capacidad sedativa. Así se desarrolló el que se considera primer antipsicótico de la historia: la Clorpromazina que probada en humanos provocaba pérdida de interés y sedación, pero no pérdidas del nivel de consciencia. Rápidamente fue probada como posible tratamiento de diversos trastornos mentales y resultó increíblemente eficaz con la psicosis presente en los pacientes esquizofrénicos, reduciendo los síntomas positivos: alucinaciones, delirios, agitación etc.

La introducción de la Clorpromazina supuso un cambio radical en la forma de tratar a los pacientes esquizofrénicos y propició los primeros estudios para el conocimiento de las bases biológicas de esta enfermedad. Así surgen las primeras hipótesis:

#### 4.5.1 HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA:

Tras descubrir la acción de la Clorpromazina como antipsicótico, el paso siguiente era, obviamente, descubrir cuál era su mecanismo de acción. La observación tanto en los pacientes tratados como en animales de experimentación del síndrome conocido como “neuroleptosis” (disminución de la capacidad psicomotora, falta de interés afectivo y letargo emocional) fue el primer indicio de cómo podían estar actuando este tipo de fármacos.

A partir de la aparición de la Clorpromazina se desarrollaron multitud de antipsicóticos. Los primeros en aparecer fueron los actualmente conocidos como Antipsicóticos Típicos o Clásicos. Éste tipo de antipsicóticos también denominados “neurolepticos” se caracterizaban, como se comprobó posteriormente, por una enorme afinidad por los receptores dopaminérgicos, sobre todo por los D2. Así se consideró que tanto la esquizofrenia, como la acción de los fármacos antipsicóticos tenía su base biológica en una sola molécula, el neurotransmisor llamado Dopamina. Esta hipótesis, denominada comúnmente “Hipótesis Dopaminérgica”, se basa en el hecho de que el tratamiento con moléculas antagonistas de la Dopamina consigue

disminuir notablemente los efectos psicóticos de enfermedades como la esquizofrenia. Ejercen así un antagonismo por ocupación de receptor: los antipsicóticos clásicos o “típicos” son esencialmente antagonistas dopaminérgicos y es este antagonismo lo que los hace eficaces como tratamiento. De hecho un neuroléptico es tanto más efectivo cuanto mayor es su afinidad por los receptores de Dopamina.

Ya que los fármacos antipsicóticos lograban paliar las psicosis y, en general los síntomas positivos de la enfermedad, y que parecían mostrar una elevada afinidad por los receptores dopaminérgicos, parecía lógico pensar que la esquizofrenia podría estar causada por algún tipo de modificación a nivel dopaminérgico. Si la inhibición de este sistema causaba una disminución de la sintomatología, el paciente esquizofrénico debería presentar una hiperactividad del sistema dopaminérgico. Esta sobreactivación podría deberse a un incremento en la síntesis de Dopamina a nivel presináptico, a una sobreexpresión de los receptores dopaminérgicos postsinápticos (incremento de su densidad) o a un aumento de la actividad de los mismos a misma cantidad de dopamina, debido, por ejemplo, a un cambio conformacional del receptor.

Otro tipo de observaciones confirmaban esta teoría: experimentos realizados con drogas estimulantes como la cocaína o las anfetaminas, conocidos agonistas dopaminérgicos, demostraban que dosis altas y repetidas llegan a causar psicosis muy similares a las relacionadas con la esquizofrenia (Griffith et al., 1972). Por otro lado se han detectado síntomas psicóticos como efectos secundarios en pacientes con Enfermedad de Parkinson tratados con L-DOPA, precursor de la Dopamina, síntomas que desaparecen al disminuir la dosis.

Hasta la actualidad se han descrito cinco receptores de dopamina: D1, D2, D3, D4 y D5 que tienen una distribución diferente en el cerebro y actúan de manera distinta: mientras D1 y D5 actúan activando la AMP ciclase mediante una proteína G acoplada, D2, D3 y D4 actúan inhibiendo esta enzima membranar. El antipsicótico clásico Haloperidol, uno de los más utilizados, tiene una alta afinidad con el receptor D2 (con un rango del 46-90%

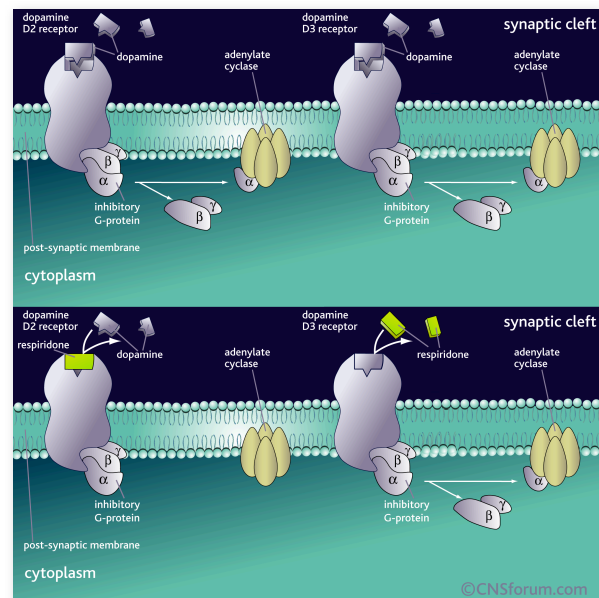


Figura 2: Mecanismo de acción de los receptores Dopaminérgicos y actuación de un antipsicótico atípico, la Risperidona. Fuente: CNS Forum, The Lundbeck Institute.

(Bernardo et al., 2001)), por lo que la mayor parte de los estudios se han basado en este receptor, que tiene una amplia distribución en el cerebro.

Existen cuatro vías Dopaminérgicas en el cerebro (ver *Figura 3*):

- 1. La Vía Nigroestriatal (desde la sustancia negra a los ganglios basales):** está relacionada con el control del movimiento. La degeneración de las conexiones neuronales de esta vía desencadena la Enfermedad de Parkinson, caracterizada por movimientos involuntarios, rigidez de extremidades y dificultades motoras. El tratamiento con antipsicóticos (especialmente neurolépticos) puede tener como efectos secundarios trastornos muy similares a los producidos por esta enfermedad, en lo que se conoce como parkinsonismo inducido, que se cree debido al bloqueo de los receptores dopaminérgicos base de la acción antipsicótica.
- 2. La Vía Mesolímbica (desde el área tegmental hasta el núcleo acumbens):** está relacionada con la conducta. Se cree que es la vía más relacionada con la psicosis, tanto la propia de la esquizofrenia, como la inducida.
- 3. La Vía Mesocortical (desde el área tegmental hasta la corteza límbica):** se cree que es la más relacionada con los síntomas negativos de la esquizofrenia
- 4. La Vía Tuberoinfundibular (desde el hipotálamo hasta la pituitaria):** está relacionada con la secreción de prolactina.

Si bien la hipótesis inicial explica la existencia de los llamados síntomas positivos mediante una sobreactivación dopaminérgica, el hecho de que los antipsicóticos típicos no tengan prácticamente efecto sobre los síntomas negativos hizo pensar que la inhibición que provocan no es efectiva contra este tipo de síntomas y por tanto que la hiperactividad dopaminérgica no es el único suceso característico de la esquizofrenia. Estudios posteriores demostraron que, si bien sí existía una hiperactividad en la vía mesolímbica por sobreactividad dopaminérgica de las neuronas postsinápticas del núcleo acumbens (lo cual causaría los síntomas positivos), existía también una hipoactividad dopaminérgica en la vía mesocortical, fundamentalmente en el córtex prefrontal, que podría ser una de las causas de los síntomas negativos.

El tratamiento con antipsicóticos clásicos o típicos conlleva, lamentablemente, una gran cantidad de efectos secundarios. Muchos de estos efectos están mediados por la misma actividad antagonista dopaminérgica que le proporciona su actividad antipsicótica. El bloqueo de la vía dopaminérgica a nivel de la Vía Nigroestriatal sería el responsable de dos de los efectos secundarios más graves del tratamiento con neurolépticos: la discinesia tardía y efectos extrapiramidales (REPs), muy relacionados con los síntomas de la Enfermedad de Parkinson.

Los importantes efectos secundarios, unidos a la falta de eficacia en lo que a síntomas negativos se refiere llevó a buscar nuevas moléculas con actividad antipsicótica. No olvidemos que, si bien los síntomas positivos son los más llamativos, son quizá los negativos los más incapacitantes y los que provocan un mayor malestar al paciente. Así aparecen los primeros antipsicóticos llamados “atípicos” o de segunda generación, de los que la Clozapina sería la punta de lanza. Se trata de fármacos que resultan efectivos tanto con los síntomas positivos como con los negativos y que presentan efectos secundarios con menor frecuencia que sus predecesores.

#### 4.5.2 HIPÓTESIS SEROTONINÉRGICA-DOPAMINÉRGICA

A finales de los años 50 aparece la Clozapina, un antipsicótico más eficaz tanto sobre los síntomas positivos como sobre los negativos y que además disminuye muchísimo los efectos secundarios (tanto discinesia tardía como REPs) comunes en los tratamientos con neurolépticos típicos. Tiene una actividad antagonista relativamente baja sobre los receptores D1, D2, D3 y D5, y elevada sobre D4. Además es agonista de receptores adrenérgicos, colinérgicos, histaminérgicos y serotoninérgicos (Roth et al., 2004). Debido a la enorme diversidad de dianas de este fármaco frente a la relativa especificidad de los neurolépticos existentes sobre los receptores dopaminérgicos D2, la Clozapina comienza a conocerse como “Antipsicótico Atípico”.

Los antipsicóticos atípicos no muestran una afinidad tan elevada como sus predecesores por los receptores dopaminérgicos en especial por el D2. Esto explicaría porqué no presentan los efectos secundarios parkinsonianos. La ocupación de los receptores D2 por la Clozapina varía (38%–63% en el estriado), pero nunca supera el 70% (medido mediante PET -tomografía de emisión de positrones-) (Farde et al.; 1992).

Sin embargo, un hecho que llamó mucho la atención fue la elevada afinidad que presenta la Clozapina por los receptores de Serotonina, los llamados 5-HT<sub>2A</sub> (Trichard et al.; 1998). Este hecho llevó a postular que era la vía serotoninérgica la

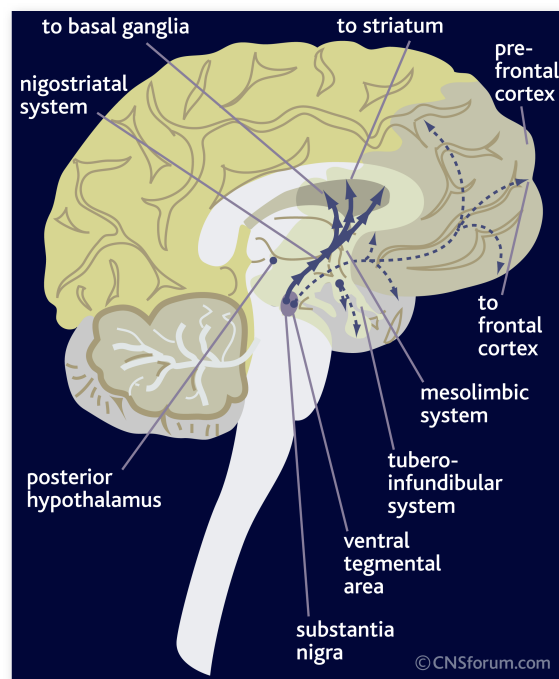


Figura 3: Vías Dopaminérgicas cerebrales en Esquizofrenia. La vía Nigroestriatal con líneas discontinuas, la mesocortical con líneas continuas. Fuente: CNS Forum, The Lundbeck Institute.

responsable principal de los síntomas negativos, pero sin embargo no conseguía explicar la efectividad que mostraba la Clozapina en pacientes resistentes a otros antipsicóticos y por tanto su efectividad sobre los efectos positivos. La llamada “Hipótesis Serotoninérgica” se basaba en la falsa similitud entre los efectos del Ácido Lisérgico Dietilamida (LSD), con actividad 5-HT antagonista, y las alucinaciones ligadas a esquizofrenia para proponer la vía serotoninérgica como la causa principal de ésta enfermedad y en concreto de sus síntomas positivos. Sin embargo esta hipótesis fue desechada porque las alucinaciones son síntomas relativamente infrecuentes en esquizofrenia, y el LSD no provoca ninguno de los otros síntomas positivos relacionados con esta enfermedad.

Pese a haberse invalidado la hipótesis serotoninérgica, las evidencias demostraban que la serotonina sí podía tener un papel importante en la esquizofrenia, fundamentalmente en lo que concierne a efectos secundarios:

Se vio que los receptores de Serotonina estaban muy expresados en la zona de la corteza prefrontal, dónde la actividad dopaminérgica parecía disminuir en pacientes esquizofrénicos. Las neuronas serotoninérgicas ejercen una actividad antagonista sobre las vías dopaminérgica mesocortical y nigroestriatal con lo cual, podría ocurrir que la hipoactividad de esta vía en la zona del córtex prefrontal sea debida a la hiperactividad serotoninérgica en esta zona. Al actuar como antagonistas de la Serotonina, los antipsicóticos atípicos como la Clozapina, actuarían disminuyendo la actividad serotoninérgica lo cual incrementaría la actividad dopaminérgica de la región prefrontal aliviando así los síntomas negativos. De hecho se ha comprobado que, si bien un antipsicótico atípico como el haloperidol bloquea un 80 % de los receptores D2 y ningún receptor 5-HT, la Clozapina ocupa un 20% de D2 y entre un 84% y 94% de los 5-HT (Farde et al., 1992; Nordström et al., 1995; Trichard et al., 1998).

Así se plantea una nueva hipótesis conocida como “Hipótesis Serotoninérgica-Dopaminérgica”, que es tal vez la más extendida en la actualidad. Se ha encontrado una disminución de la densidad de receptores serotoninérgicos (fundamentalmente de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>) en la zona prefrontal de individuos esquizofrénicos con respecto a individuos sanos, pese a que no esté suficientemente probado que ello implique una disminución de actividad serotoninérgica de la vía Mesocortical.

Sin embargo sigue abierta la duda de cuál es el mecanismo antipsicótico de este medicamento de segunda generación y cómo es capaz de actuar sobre los síntomas positivos de forma tan eficiente como los típicos (o más), mostrando una afinidad mucho menor por los receptores de Dopamina, especialmente los D2.

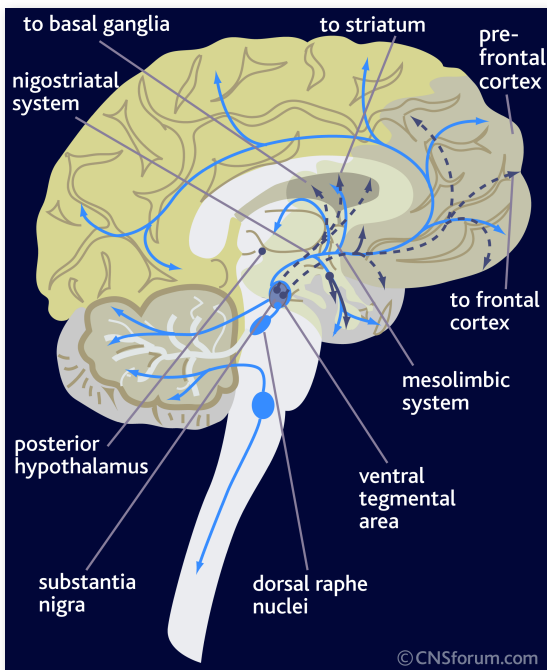


Figura 4: Vías Serotoninérgicas cerebrales.  
Fuente: CNS Forum, The Lundbeck Institute.

Se sabe que, pese a que la afinidad de la Clozapina por los D2 es relativamente menor que la mostrada por antipsicóticos de primera generación, existe una marcada selectividad de este neuroléptico por el receptor D4. Se ha postulado que es esta acción selectiva la que hace que la Clozapina sea efectiva en el caso de las esquizofrenias resistentes a antipsicóticos. Estudios de expresión *in vivo* y actividad de los receptores en las distintas zonas cerebrales serían necesarios para profundizar en el conocimiento de una enfermedad cuya causa aún sigue sin conocerse.

Pese a las increíbles virtudes de la Clozapina, un efecto secundario especialmente adverso, la agranulocitosis (falta de producción de glóbulos blancos provocada por un efecto tóxico sobre la médula ósea), hizo que su uso se restringiese y que se buscasen nuevas opciones,

fármacos derivados de la clozapina con idénticas virtudes pero evitando este inconveniente. Así surgen el resto de los antipsicóticos “atípicos” o de segunda generación: Olanzapina, Risperidona, Quetiapina, Ziprasidona. Partiendo de la teoría Serotoninérgica-Dopaminérgica que explica el éxito de la Clozapina se buscaron nuevas moléculas con actividad antagonista tanto de los receptores de Dopamina (D2) como de los receptores de Serotonina 5-HT2 (fundamentalmente 5-HT2A y 5-HT2C). El balance entre el antagonismo dopaminérgico y el antagonismo serotoninérgico es uno de los factores que más difieren entre los diferentes antipsicóticos atípicos, por ejemplo la Risperidona, cuyo efecto sobre los síntomas positivos se equipara al del Haloperidol, ocupa un 50 % de los receptores D2 y un 60% de los 5-HT2. Como los fármacos con actividad antagonista sobre 5-HT2 únicamente no parecen tener efecto sobre los síntomas positivos de la esquizofrenia (no así sobre los negativos), parece que si es necesaria la acción antagonista sobre los receptores dopaminérgicos para lograr disminuir los síntomas positivos. Los nuevos antipsicóticos actuarían conjuntamente sobre los dos tipos de receptores, pero el efecto sería diferente según la zona del cerebro, ya que las conexiones entre las vías dopaminérgicas y serotoninérgicas no están presentes en todas ellas: en la zona mesolímbica no existe conexión entre estas dos vías, con lo cual la acción antagonista de los antipsicóticos atípicos sobre los receptores D2 disminuiría la actividad dopaminérgica, anormalmente elevada en esquizofrénicos, en la vía meso-

límbica disminuyendo así los efectos positivos. Sin embargo, en la zona mesocortical, relacionada con los síntomas negativos, si existen estas conexiones, de forma que, aunque la actividad dopaminérgica disminuye aún más (recordemos que en pacientes con esquizofrenia la actividad dopaminérgica en esta zona está anormalmente reducida) debido al antagonismo D2 del fármaco, la acción antagonista 5-HT<sub>2</sub> compensa este efecto (ya que la vía serotoninérgica tiene actividad antagonista sobre la dopaminérgica), disminuyendo así los síntomas negativos de la enfermedad. Además, también la zona nigroestriatal (reacionada con el movimiento) presenta conexiones entre estas dos vías, con lo que los antipsicóticos de segunda generación actuarían en esta zona de igual forma que sobre la mesocortical. Esto explicaría porqué estos antipsicóticos presentan menos efectos secundarios de tipo motriz (EPS o discinesia tardía) que los típicos.

Actualmente, la Clozapina sigue siendo el fármaco de referencia en los casos de esquizofrenia resistente a los antipsicóticos, pero debido a la posibilidad de desarrollar agranulocitosis es necesaria una monitorización completa complementaria al tratamiento. Otros antipsicóticos atípicos ampliamente utilizados en la actualidad son la Risperidona, la Olanzapina, la Quetiapina, o la Ziprasidona. Aún se utilizan antipsicóticos clásicos en el tratamiento de la esquizofrenia, fundamentalmente Haloperidol, pero su uso es bastante limitado debido a su ineficacia con los síntomas negativos y a su mayor índice de reacciones adversas, fundamentalmente extrapiramidales.

Además de los tratamientos orgánicos, existen otras actuaciones dirigidas a la rehabilitación del paciente tanto en el campo laboral (terapias ocupacionales), como en el campo socio-familiar (psicoeducación, psicoterapia, etc.). Este tipo de terapias pueden resultar tan importantes como las farmacológicas y en la actualidad suelen realizarse de forma paralela siempre que es posible.

## 5. IMPACTO DE LA FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA

Podemos repasar las condiciones necesarias para la aplicación de la farmacogenética, enfocándolas al caso particular de la esquizofrenia:

### 5.1 En el campo de la enfermedad y su tratamiento:

Hay que tener en cuenta que la esquizofrenia es una enfermedad **altamente discapacitante** y con una **prevalencia** elevada (0,7-1%), lo cual supone alrededor

de los 400.000 afectados en España (unos 27.000 en Galicia). Además se diagnostican entre 60.000 y 90.000 nuevos casos al año.

Si bien la idea del tratamiento individualizado parece útil para todos los tratamientos, existe un subgrupo en el que cobra especial relevancia: aquellos en los que los efectos secundarios son altamente frecuentes y dificultan el tratamiento, bien por su gravedad, bien por su naturaleza, y aquellos en los que la optimización de la dosis implica mucho tiempo por la vía del ensayo-error con los problemas que ello conlleva. Lamentablemente los antipsicóticos cumplen ambas razones: pese a que existen diagramas de decisión a la hora de suministrar el tratamiento en un primer brote psicótico, es mucho más común que cada facultativo, según su experiencia, o preferencias personales, recomiende un fármaco u otro. Acertar a la primera con el tratamiento es bastante infrecuente y, por lo general, suele probarse con varios medicamentos y con varias dosis antes de dar con el idóneo. Suelen pasar meses e incluso años hasta que se logra un tratamiento correcto para el paciente, tiempo en el cual la enfermedad sigue su curso. En esquizofrenia es especialmente importante el tiempo de respuesta ante la primera crisis, no sólo por razones físicas o bioquímicas, sino por el impacto psicológico que la enfermedad tiene sobre el paciente (Emsley et al., 2006). Igualmente, aunque las reacciones adversas son menos frecuentes y severas con los antipsicóticos atípicos, pueden aparecer con una frecuencia elevada: desde incremento o pérdida de peso, astenia, hipocinesias, parestesia, diabetes, aumento de los triglicéridos, amenorrea, galactorrea, disfunción sexual o falta de salivación, hasta agranulocitosis o, aunque en menor medida que con los típicos, Discinesia tardía. Otros efectos secundarios son infrecuentes. Habitualmente muchos de estos efectos secundarios implican necesariamente la aplicación de un cotratamiento que puede llegar a interferir el efecto del tratamiento antipsicótico principal en ciertos casos. El abandono del tratamiento es muy frecuente en los pacientes esquizofrénicos (se estima en un 74%) y los efectos secundarios, muchas veces inevitables, son la primera causa (Jeffrey et al., 2005).

Por otro lado, los tratamientos antipsicóticos, presentan una ventana terapéutica muy estrecha, con lo cual la detección de la dosis óptima es una tarea difícil. Se estima que un 25-30% de los pacientes son resistentes al tratamiento.

Podría decirse que el paciente esquizofrénico es muy sensible a la respuesta al tratamiento, fundamentalmente debido a la naturaleza de la enfermedad. Sería por tanto idóneo poder predecir qué tratamiento produciría menos efectos secundarios y mayor respuesta a la hora de aplicar el primer tratamiento.

## 5.2 En el campo económico:

El gasto sanitario de un paciente esquizofrénico es muy elevado, y se ve incrementado por la falta de adherencia al tratamiento y la presencia de reacciones adversas al tratamiento antipsicótico, que suelen aumentar el gasto debido a la adición de nuevos tratamientos para contrarrestarlos.

La esquizofrenia representa en Europa el 1,9% del gasto sanitario total y se estima que el gasto público de la esquizofrenia alcanza el 0,6% del PIB anual, en EEUU.

Se ha estimado que el coste total de la esquizofrenia, tanto directo como indirecto, asciende en España a unos 70.000 millones de euros anuales (Seva, 2002). Además, la situación de dependencia de la mayor parte de los esquizofrénicos implica que es la familia la que se hace cargo de la situación del paciente y se estima que el porcentaje del gasto total que es soportado por ella puede ser superior al 80%.

<p><i>Zeldox</i> (Ziprasidona): 80-160mg/día; <i>Zeldox</i> envase con 56 cápsulas: 209,52 € <i>Leponex</i> (Clozapina): 300-450 mg/día; <i>Leponex</i> 100, envase de 40 cp: 25,75 € <i>Zyprexa</i> (Olanzapina): 10-30mg/día; <i>Zyprexa</i> 10 mg velotab caja de 28 comprimidos: 143,92 € <i>Risperdal</i> (Risperidona): 3-9mg/día; <i>Risperdal</i> 3 mg, envase con 60 cp: 140,37 € <i>Seroquel</i> (Quetiapina): 150-750mg/día; <i>Seroquel</i> 200mg, envase de 60 cp: 138,54 €</p>
--

*Tabla 1: Dosis Medias y precios de los Antipsicóticos Atípicos más comunes*

Hay que tener en cuenta que las fases agudas generadas por los primeros brotes y recaídas suelen precisar el ingreso del paciente y el gasto de una cama hospitalaria en el sistema sanitario gallego (SERGAS) es de 273,94 €. Además, los tratamientos con antipsicóticos atípicos son especialmente caros (ver *Tabla 1*).

La falta de respuesta al tratamiento provoca un aumento de la morbi-mortalidad de la enfermedad, del coste social y laboral y un aumento del número de ingresos (un 37% por falta de adherencia y un 63% por la falta de respuesta). La estrategia utilizada de ensayo y error requiere un mínimo de 6 semanas con cada fármaco a dosis óptima (muchas veces es necesario titular lentamente las dosis debido a los efectos secundarios) antes de poder considerar al paciente resistente a dicho producto. Con Clozapina este tiempo es todavía mayor llegándose a considerar necesario hasta 6 meses de tratamiento.

### 5.3 En el campo social:

Se estima que el 84% de los pacientes esquizofrénicos viven con sus familias en situación de dependencia. La vida “productiva” de un paciente esquizofrénico suele ser muy corta, teniendo en cuenta que se trata de una enfermedad que causa discapacidad en un elevado número de casos. Esto implica un enorme gasto para las familias, tanto económico como personal y social. El paciente esquizofrénico suele presentar un bajo grado de integración social, debido tanto a la naturaleza de la enfermedad (muchos de los síntomas negativos se relacionan con este problema) como a dificultades derivadas de los efectos secundarios del tratamiento.

Además del tratamiento farmacológico es indispensable para los pacientes esquizofrénicos, y recomendable para las familias, la complementación con tratamientos psicoterapéuticos, programas de psicoeducación, terapia ocupacional, etc., ya que hablamos de pacientes que deben enfrentarse a una enfermedad crónica que precisa una modificación de los hábitos y un esfuerzo extra a nivel de integración social. Este tipo de terapias son tanto más efectivas cuanto más efectivo sea el tratamiento orgánico tanto a nivel de respuesta como a nivel de reacciones adversas. Lamentablemente estas actuaciones no suelen entrar dentro del gasto sanitario dedicado a estos pacientes, y existe un entramado de asociaciones que soportan el gasto derivado de estas terapias de rehabilitación, en muchos casos subvencionadas, pero en su mayoría soportadas mediante un esfuerzo altruista.

Hay que tener en cuenta que la mortalidad en los pacientes con esquizofrenia es sustancialmente más elevada que la de la población sana, aproximadamente un 8% mayor. Esto es en gran parte debido a que la tasa de intento de suicidio en estos pacientes se estima entre un 25 y un 50% (Harris et al., 1997). La continuidad de los síntomas derivada de la falta de efectividad del tratamiento o la falta de adherencia es, probablemente, una de las causas principales de este dato.

### 5.4 En el campo técnico:

La tecnología actual permite análisis rápidos, sensibles, altamente específicos y con un coste bajo. Por lo general las técnicas de genotipado actuales resultan más baratas cuanto mayor sea el número de muestras a analizar, por lo que resultan idóneas para su utilización de forma generalizada.

El otro punto a tener en cuenta es el **estado del conocimiento** actual tanto de la esquizofrenia y su etiología como de los fármacos y sus mecanismos de acción, así

como de los marcadores genéticos relacionados con la respuesta a los antipsicóticos atípicos. Con respecto a las causas de la enfermedad, existen aún numerosas incógnitas al respecto, y las evidencias permiten únicamente la elaboración de hipótesis (ver *Introducción: Etiología y Tratamiento*), pero, en tanto en cuanto han permitido el desarrollo de fármacos efectivos, dicho conocimiento parece suficiente. Lo mismo ocurre con los mecanismos de acción de los fármacos, pero ¿qué ocurre con el conocimiento sobre las variantes genéticas y su relación con la respuesta al tratamiento?. ¿Poseemos el conocimiento suficiente para aplicarlo y desarrollar una herramienta farmacogenética útil?

## 6. ESTADO DEL CONOCIMIENTO SOBRE LOS GENES IMPLICADOS EN LA FARMACOGENÉTICA DEL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA:

### 6.1 GENES DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT2

La importancia de los receptores de Serotonina 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, tanto en esquizofrenia como en su tratamiento, está suficientemente demostrada como para justificar el estudio de variaciones genéticas que pudiesen estar ligadas tanto a los cambios que se aprecian en la enfermedad como a las variaciones detectadas a nivel de respuesta antipsicótica entre pacientes. Es más, es muy posible que detectando relaciones en un campo obtengamos respuestas para el otro. Estas variaciones genéticas pueden ser causales: SNPs no sinónimos (que cambian algún aminoácido de la proteína que codifica) o modificaciones a nivel de promotor, o bien SNPs sinónimos que por desequilibrio de ligamiento con posiciones causales, sirviesen bien para detectar la posición causal, bien para establecer algún tipo de asociación predictiva.

#### 6.1.1 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT<sub>2C</sub> (HTR<sub>2C</sub>) Y SU VARIANTE CYS 23 SER

5-HT<sub>2C</sub> es un receptor postsináptico ligado a proteína G cuyo gen, *HTR<sub>2C</sub>*, se localiza en el cromosoma Xq24 y por el que tanto Clozapina como Olanzapina (dos de los antipsicóticos atípicos más efectivos) han demostrado una elevada afinidad, a diferencia de otros antipsicóticos que la presentan más somera. Esto hace del gen *HTR<sub>2C</sub>* un candidato excelente para los estudios tanto de asociación con la enfermedad como farmacogenéticos, de asociación con la respuesta.

Casi todos los estudios del receptor 5-HT<sub>2C</sub> se han centrado en un polimorfismo situado en la región codificadora, un cambio de G por C en la posición 68, que provoca un cambio de Cisteína por Serina en el codón 23 de la proteína, que afecta a la porción N-Terminal del receptor modificando su estructura. La variante 23Ser parece ser la menos común pese a que se han descrito diferencias poblacionales entre Caucásicos y Afrodescendientes Americanos

Este cambio parece no tener efecto en la respuesta del receptor a Serotonina *in vitro*. Estudios *in vivo* realizados mediante el uso de antagonistas específicos de 5-HT<sub>2C</sub> tampoco resultan concluyentes. Segman y colaboradores, en un intento de ligar este polimorfismo con esquizofrenia, demostraron que los pacientes crónicos con la variante 23Ser permanecían más tiempo hospitalizados que aquellos con la variante 23Gly (Segman et al., 1997). Los primeros estudios farmacogenéticos, realizados por Sodhi et al en 1995 en población de Europa Occidental, sobre esta variable y la respuesta a la Clozapina, tomada como el paradigma de los antipsicóticos atípicos, demostraban una fuerte relación, estadísticamente significativa, de la variante 23Ser con una mejor respuesta. En este estudio, el 90% de los pacientes que presentaban al menos uno de los alelos 23Ser fueron clasificados como respondedores a Clozapina, mientras que sólo lo fueron el 50% de los que no lo tenían. Varios estudios posteriores (Malhotra et al., 1996; Rietschel et al., 1997) fueron incapaces de replicar estos resultados en otras poblaciones europeas y americanas y otros (Arranz et al., 2000a, 2000b) mostraron una tendencia no significativa de asociación entre este alelo y una buena respuesta a Clozapina. Un metaanálisis posteriormente realizado por Veenstra-VanderWeele (2000) demuestra esta relación utilizando todos los datos de los estudios existentes. Estos datos están pendientes de replicación.

Además del polimorfismo del codón 23 se han descrito varios polimorfismos a nivel del promotor: tres SNPs (-995 G/A, -759 C/T y -697 G/C) y un polimorfismo de repetición (-1027 (GT)). Se ha visto que varios haplotipos definidos por estos polimorfismos podrían incrementar la actividad del promotor (Yuan et al.; 2000). Arranz y colaboradores encontraron que la capacidad predictiva del análisis del gen HTR<sub>2C</sub> se ve incrementada si al genotipado de Cys23Ser se le añade el del polimorfismo de repetición del promotor -1027 (GT) (Arranz et al., 2000b).

Se han realizado otros estudios dirigidos a asociar este gen con los efectos secundarios derivados del tratamiento antipsicótico, fundamentalmente la Discinesia Tardía y el incremento de peso con resultados prometedores aunque aún poco concluyentes (Eberle-Wang et al., 1996).

### 6.1.2 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT<sub>2A</sub> (HTR<sub>2A</sub>) Y SUS VARIANTES 102C/T E HIS452TYR.

El receptor de Serotonina 5-HT<sub>2A</sub> pertenece, al igual que 5-HT<sub>2C</sub> a la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> con probadas implicaciones en la sintomatología de la esquizofrenia y en la efectividad de los antipsicóticos de segunda generación. Al igual que ocurre con 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> presenta una elevada afinidad por Clozapina y Olanzapina, afinidad que podría tener mucho que ver en la efectividad de estos fármacos en los síntomas negativos y posiblemente también en los positivos.

Al igual que el 2C, el 5-HT<sub>2A</sub> es un receptor postsináptico acoplado a proteína-G. Su gen HTR<sub>2A</sub> se encuentra en la región cromosómica 13q14-21. Como es lógico, el descubrimiento de la relación entre la vía serotoninérgica y los síntomas de la esquizofrenia (Hipótesis Serotoninérgica / Serotoninérgica-Dopaminérgica) puso en el punto de mira a este gen y sus variantes polimórficas y pronto se comenzó a buscar asociaciones genotipo-fenotipo. Los SNPs más estudiados son el polimorfismo no sinónimo His452Tyr y el polimorfismo silente 102C/T.

#### a) HIS452TYR.

El cambio de una Histidina por una Tirosina en el codón 452 se debe a un polimorfismo C por T en el gen HTR<sub>2A</sub>. Éste aminoácido se encuentra en la cola C-Terminal citoplasmática del receptor, encargada de activar la proteína-G e iniciar la puesta en marcha del fosfatidilinositol. Los estudios de Hazelwood y colaboradores han demostrado que la sustitución de un aminoácido básico His por uno neutro Tyr provoca que el receptor sea ineficaz a la hora de activar esta proteína y cumplir así su función (Hazelwood et al., 2004). Además esta mutación no influye en la expresión del receptor ni impide la unión de las moléculas, únicamente modifica su eficacia funcional. En el caso de la acción de los antipsicóticos, esta modificación impediría o disminuiría su eficacia. Esto ya había sido comprobado con anterioridad por los estudios de Arranz y colaboradores (Arranz et al., 1995, 1996, 1998a) y de Masellis (Masellis et al., 1998) y confirmaría el hecho de que el alelo 452Tyr se encontrara con mayor frecuencia entre pacientes esquizofrénicos no respondedores a la Clozapina (Arranz encontró una asociación con  $P = 0.07$  entre respuesta y genotipo completo,  $P = 0.02$  entre respuesta y genotipo considerando recesivo al alelo Tyr452 y  $P = 0.02$  entre respuesta y la presencia del alelo). Un metaanálisis realizado por la misma Arranz posteriormente volvió a confirmar esta asociación (Arranz et al, 1998b).

Esta mutación también ha sido relacionada por la Dra. Arranz con la susceptibilidad a esquizofrenia (Arranz et al., 1995). Aunque otros intentos de réplica por parte de otros equipos resultaron infructuosos (Noethen et al., 1995), el estudio fue replicado varias veces desde entonces (Spurlock et al., 1995).

## b) 102C/T

Se trata de un polimorfismo sinónimo, estudiado en relación tanto a la susceptibilidad de la esquizofrenia como a la eficacia del tratamiento con Clozapina. Teniendo en cuenta que el cambio en el nucleótido 102 no induce cambio alguno en la secuencia aminoacídica del receptor, es de esperar que este SNP se encuentre en desequilibrio de ligamiento con algún otro, ya sea de la región codificadora, ya sea de la zona del promotor. El grupo de Inayama realizó en 1996 un estudio de asociación con 62 pacientes y 96 controles en el que se demostraba que este polimorfismo se encontraba con mayor frecuencia en pacientes esquizofrénicos que en individuos sanos ( $P = 0.049$ ). Este estudio fue replicado por Erdmann y colaboradores ese mismo año (Erdmann et al., 1996). Con respecto a la asociación de este polimorfismo con la respuesta antipsicótica, (Arranz et al., 1995) encontraron en que el alelo 102 C estaba significativamente sobre-representado entre los no respondedores con respecto a los respondedores en población de Europa Occidental. Pese a que varios estudios posteriores (Malhotra et al., 1996) no consiguieron replicar estos resultados (la mayor parte de ellos basados en poblaciones caucasoides no europeas), un nuevo metaanálisis del grupo de Arranz utilizando los ocho estudios existentes hasta la fecha confirmó los resultados iniciales (Arranz et al., 1998). Varios estudios posteriores detectaron que el SNP 102 C/T estaba en fuerte desequilibrio de ligamiento con respecto a un polimorfismo del promotor: -1438 A/G. Es posible que esta relación explique la relación entre el SNP silente y la respuesta a antipsicóticos. Los estudios de expresión del gen HTR2A con la variación de la secuencia a nivel de promotor aún no son concluyentes. Existe la posibilidad de que el desequilibrio de ligamiento no sea completo en ciertas poblaciones, lo que explicaría los datos discordantes de los distintos estudios. Sin embargo, basándonos en el metaanálisis, el estudio más amplio realizado hasta la fecha, y teniendo en cuenta que la población de éste estudio es, básicamente europea, podemos tomar este polimorfismo como parte del panel de polimorfismos implicados en respuesta antipsicótica. Un estudio de gran impacto aunque nunca replicado presentado por Arranz y colaboradores en Lancet indicaba que la posesión del alelo 102 T y el genotipo His452/His452 está asociado con buena respuesta en el 80 % de los pacientes (Arranz et al., 2000b).

## 6.2 GEN DEL RECEPTOR DE HISTAMINA H2 Y SU VARIANTE -1018 G>A

Indirectamente, el sistema Histaminérgico ha jugado un importante papel en el desarrollo de la neuropsicofarmacología. No olvidemos que el descubrimiento de los primeros antipsicóticos (Clorpromazina) partieron del análisis de sustancias con actividad “antihistamínica” (esencialmente eran agonistas del receptor H1) y que gracias a este descubrimiento se produjo un cambio radical en la forma de entender y tratar enfermedades como la esquizofrenia.

El sistema Histaminérgico ha cobrado cierta relevancia al descubrirse su relación con las funciones cognitivas y emocionales a nivel del cerebro. Las neuronas histaminérgicas forman un sistema similar al de otras neuronas monoaminérgicas, como las dopaminérgicas o las serotoninérgicas, que se ramifican hasta alcanzar diversas zonas cerebrales. Estudios en ratones demuestran que existe un incremento en la actividad de las neuronas histaminérgicas al administrar metaanfetamina (recordemos que esta sustancia produce un incremento de la actividad dopaminérgica y síntomas muy similares a los de la esquizofrenia), incremento que puede ser detenido mediante la administración de un antipsicótico, lo cual indica que existe una gran relación entre el sistema histaminérgico y el dopaminérgico, y por tanto la esquizofrenia (Arrang et al., 2007)

Los receptores histaminérgicos son, al igual que los serotoninérgicos, receptores acoplados a proteína-G, mediante la cual median su función. Existen cuatro tipos de receptores de Histamina: H1, H2, H3 y H4

Se sabe que la Clozapina presenta afinidad por el receptor H1, al igual que otros antipsicóticos. Se cree que el receptor H1 podría tener que ver con el incremento de peso observado en pacientes tratados con estos antipsicóticos con actividad antagonista H1, ya que la histamina parece estar relacionada con la inhibición de la necesidad de ingesta de comida.

El receptor de Histamina 2 (H2), al igual que toda su familia, está acoplado a proteína-G mediante la cual se produce la activación de la Adenilato-ciclase encargada de activar a su vez la Proteinkinasa A. Al igual que H1, H2 media una acción excitadora sobre las neuronas postsinápticas. Se expresa ampliamente en las neuronas de la mayoría de las zonas del córtex cerebral. Se ha comprobado que varios antidepresivos tricíclicos y ciertos antipsicóticos exhiben una inhibición potente de la adenilato ciclase ligada a los receptores H2 lo cual implica que éste receptor podría tener bastante relación con la respuesta a este tipo de fármacos. Además se ha

comprobado que la Clozapina presenta una elevada afinidad por este receptor (Roth et al., 2004)

En 2000, el artículo publicado por Arranz en *Lancet*, aseguraba que utilizando este polimorfismo en combinación con 5-HT<sub>2A</sub> 102 T/C, His452Tyr, 5-HT<sub>2C</sub> -330 GT/-244 CT, 5-HT<sub>2C</sub> Cys23Ser y un polimorfismo (5-HTTLPR) del transportador de Serotonina se consigue un nivel de predicción del 76,86% (Arranz et al., 2000b). Este estudio no ha sido replicado. Sin embargo otro estudio independiente llevado a cabo de forma casi simultánea en Alemania por el equipo de J. Schumacher y que era incapaz de replicar en su totalidad los resultados del anterior, arrojaba una asociación significativa del alelo -1028 A y una buena respuesta a este fármaco, relación que se diluía debido a la baja frecuencia de este alelo (Schumacher et al., 2000).

### 6.3 CITOCROMOS P450:

Conocemos como Citocromo P450 (comúnmente CYPs) a una superfamilia de enzimas evolutivamente muy conservadas, presentes tanto en animales como en bacterias y plantas.

Descubiertos en los años 40, los Citocromos P450 reciben su nombre de la capacidad de estas moléculas, en su forma reducida y unida a monóxido de carbono, de absorber la luz a longitudes de onda máximas de 450 nm (Pigmento a 450nm: P450). Este fenómeno se debe a la presencia de un grupo Hemo (protopofirina IX) en su sitio activo, que le permite realizar su función como enzimas de Fase I (Oxidación /Reducción / Hidrólisis). Poseen entre 400 y 500 aminoácidos.

La biotransformación tanto de moléculas exógenas como de moléculas endógenas sucede en dos fases:

- Fase I: se realiza mediante monooxigenasas dependientes de Citocromo P450
- Fase II: en las moléculas resultantes de la fase I se conjugan con moléculas endógenas (sulfatos, ácido glucurónico etc...)

Este sistema tiene como objetivo incrementar la hidrosolubilidad de las moléculas con el fin de que sean excretadas por la orina o como parte del proceso de bioactivación.

En animales los CYPs se encuentran asociados a la membrana mitocondrial interna y las membranas del Retículo Endoplasmático Liso (microsomias) donde realizan de biotransformación. En humanos se expresa en numerosos tejidos, intestino, pulmones, testículos, piel, etc.... pero, sin embargo, son los CYPs presentes en el hígado los más estudiados debido a que en este órgano tiene lugar una parte importante del metabolismo de sustancias exógenas, entre las que figuran los fármacos.

Se trata de enzimas de baja especificidad, ya que la mayoría actúan sobre múltiples sustratos y en numerosas reacciones. Cumplen numerosas funciones en el organismo: como detoxificador de sustancias exógenas (venenos, pesticidas, fármacos...), en la degradación de sustancias endógenas derivadas del metabolismo (como vitaminas, hormonas, etc.), pero también en la bioactivación de ciertos compuestos que son inactivos en su forma habitual y son transformados a su principio activo (por ejemplo ciertos profármacos) o en la síntesis de ciertas toxinas que actúan contra los patógenos, como el Óxido Nítrico.

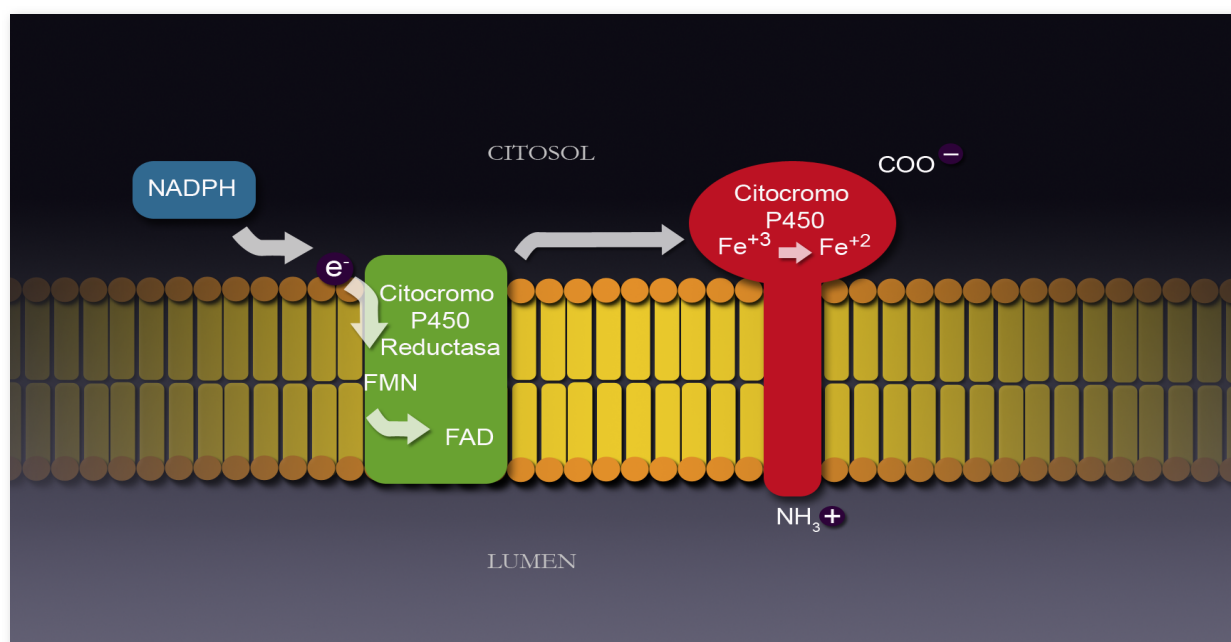


Figura 5: representación del sistema del Complejo Citocromo P450 Reductasa- Citocromo P450 en la membrana celular

Muchas de las sustancias exógenas son liposolubles, con lo cual pueden atravesar las membranas e interferir en los procesos normales de las células, provocando reacciones farmacológicas o toxicológicas dependiendo de la naturaleza de la sustancia. La función de las enzimas del grupo P450 es oxidar estos compuestos ha-

ciendo que pierdan su lipofilidad y convirtiéndolos en derivados electrofílicos (Fase I) que más tarde serán convertidos mediante otras enzimas de Fase II (acetiltransferasas, glucotransferasas, etc....) a derivados hidrofílicos para su excreción. Este proceso de monooxigenación se logra mediante la adición de un grupo hidroxilo a las moléculas, para lo cual es imprescindible la presencia de NADPH (Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato) y O<sub>2</sub> (Oxígeno molecular). La reacción de monooxidación catalizada por las enzimas Citocromo P450 es:

Sustrato-H + NADPH + H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub> → Sustrato-OH + NADP<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O. (ver Figuras 5 y 6)

Esto ocurre con los fármacos, sobre los que el sistema CYP es el responsable principal del metabolismo oxidativo de Fase I afectando así a las concentraciones sanguíneas del principio activo. Si la oxidación ocurriese muy rápido el fármaco no causaría efecto, ya que su degradación se vería acelerada permaneciendo el compuesto terapéutico muy poco tiempo en la sangre. Por el contrario, si el CYP encargado de la oxidación de dicho fármaco tuviese menor actividad de lo normal, el fármaco permanecería demasiado tiempo en el sistema sin ser eliminado, lo cual haría que se acumulase hasta alcanzar niveles tóxicos, que podrían producir reacciones adversas graves. Existen varias causas externas para que un CYP altere su actividad: ciertos fármacos pueden inhibir la actividad de ciertos CYPs, con lo cual hay que tener cuidado con la comedición si se está utilizando un fármaco metabolizado por CYPs. Además existen hábitos alimenticios o costumbres que pueden influir en la actividad de los CYPs, por ejemplo el zumo de pomelo, que inhibe las isozimas CYP3A y CYP1A2. Sin embargo, un hecho que caracteriza a muchos CYPs humanos es la existencia de variaciones a nivel genético que pueden modificar la actividad metabólica de la isozima por si mismos o hacerla más susceptible a alteración (inducción o inhibición) por parte de factores externos, de forma que naturalmente podemos detectar variaciones importantes en la actividad de los CYPs que no son debidos a factores externos. Son, lógicamente, estas variaciones a

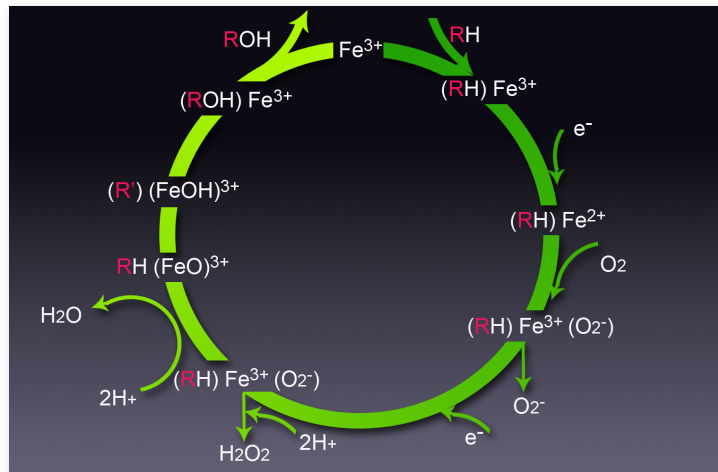


Figura 6: representación simplificada la reacción de monooxidación mediada por el complejo Citocromo P450. R es la molécula sustrato.

nivel genético las que hacen de los Citocromos P450 las estrellas indiscutibles de la Farmacogenética.

Según la nomenclatura estandarizada, la superfamilia de los CYPs se divide en **familias**, cuyos miembros deben compartir más del 40% de sus aminoácidos. Identificada mediante un número tras la palabra CYP, en la actualidad hay 708 familias (a 11 de Abril de 2007), de las cuales 101 pertenecen a animales. Cada familia se divide en **subfamilias**, que se identifican mediante una letra mayúscula. Los enzimas pertenecientes a la misma subfamilia deben tener al menos un 55% de sus aminoácidos en común. En 2004 se habían identificado 814 subfamilias, de las cuales 233 pertenecían a animales. Un nuevo número identifica al enzima de forma individual.

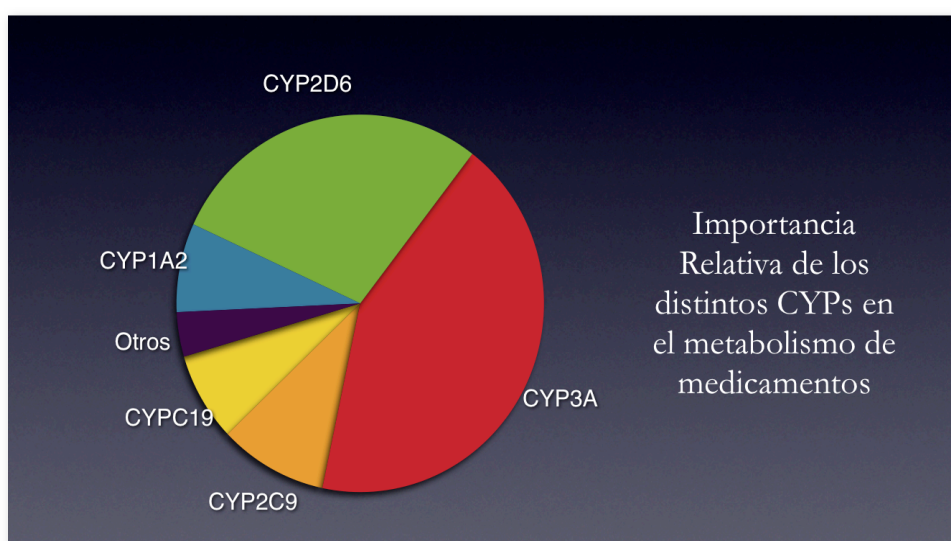


Figura 7: Importancia relativa de los distintos CYPs en el metabolismo de medicamentos.

Los CYPs humanos, siendo uno de los genes más estudiados dentro de la farmacogenética, poseen además una clasificación, según las combinaciones haplotípicas de sus variantes polimórficas, en “alelos”, definidos según el *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Comité*. Utilizando esta nomenclatura, los alelos se identifican mediante un asterisco seguido de un número (por ejemplo: CYP2D6\*2). Además existen subtipos de algunos alelos, que se localizan mediante una letra mayúscula (por ejemplo: CYP2D6\*2D). Esta es la clasificación más extendida y se encuentra totalmente consensuada. Muchos de los “alelos” están definidos únicamente por un polimorfismo, pero lo general es que se definan mediante una combinación (a veces bastante extensa) de modificaciones polimórficas con respecto al alelo salvaje. Esto hace que la denominación de “alelos” no sea quizá la más correcta. Algunos de estos cambios son no sinónimos y posiblemente su cambio sea cau-

sal para en la alteración de la actividad enzimática, pero la mayoría son polimorfismos sinónimos, que se relacionan con el cambio en la actividad enzimática en combinación haplotípica con otros. De los alelos más importantes suelen existir estudios sobre la actividad enzimática, algunos realizados *in vitro*, otros *in vivo*.

Los CYPs hepáticos más estudiados por su relevancia en el metabolismo y aclaramiento de los fármacos son los de la familia 1A, 2D, 2C y 3A (van der Weide et al., 1999).

Antipsicótico	Vía del Complejo Citocromo P450
Ziprasidona	CYP3A4
Risperidona	CYP2D6
Olanzapina	CYP1A2
Quetiapina	CYP3A4
Haloperidol	CYP3A4, CYP2D6
Clozapina	CYP1A2

Tabla 2: implicación de los distintos CYPs en el metabolismo de los antipsicóticos más utilizados.

### 6.3.1 GEN DEL CITOCROMO P450 1A2 (CYP1A2):

El CYP1A2 representa el 15% aproximadamente de los CYPs hepáticos y aunque, en importancia relativa, no metaboliza un número elevado de fármacos de uso frecuente, en comparación con otros CYPs como el CYP2D6, la familia CYP3A o la CYP2C, es relativamente importante debido al uso de los fármacos que metaboliza (Shimada et al., 1994). Está implicado en la demetilación de la cafeína en los microsomas hepáticos, quizá el paso más importante en la biotransformación de esta molécula, la cual depende en más de un 90% de la actividad de esta enzima (de Leon et al., 2003), por lo cual se utiliza la tasa de demetilación de cafeína como método para establecer la actividad de la enzima (fenotipado) (Bertilsson et al. 1994). Se ha visto que factores externos modifican de forma importante su actividad, como por ejemplo el tabaco: se ha visto que el metabolismo de CYP1A2 (medido mediante la demetilación de cafeína) se ve incrementado notablemente en fumadores (hasta un 1,5% de incremento), debido a la acción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el tabaco (De Leon, 2004). Este fenómeno afectaría también a todos los fármacos que están metabolizados por la vía del CYP1A2 (Van der Weide et al., 2003).

La influencia de factores externos sobre la actividad de CYP1A2 es altamente relevante, ya que muchos de sus inductores e inhibidores son sustancias de uso habitual. Como **inductores** hay que destacar el tabaco, pero también medicamentos

muy utilizados como el Omeprazol, la Rifampina, el Ritonavir o la Carbamazepina. Posiblemente CYP1A2 pueda ser inducido por ciertos alimentos como el brócoli, pero este punto no está demostrado. Como **inhibidores**, los antidepresivos fluoxetina y fluvoxamina (Jeppsen et al., 1996) utilizados muchas veces en comedición con antipsicóticos y la cafeína o los antidepresivos tricíclicos (Amitriptilina, Nortriptilina) que actúan como competidores de otros fármacos.

CYP1A2 explica aproximadamente el 70% el metabolismo de la Clozapina, catalizando el paso de Clozapina a N-Demetil-Clozapina a nivel hepático, un metabolito con limitada actividad farmacológica. También la Olanzapina usa principalmente (en un 60% aproximadamente) la vía del CYP1A2 para la formación de sus metabolitos principales N-demetil-Olanzapina y 7-hidroxi-Olanzapina. Se sabe además que la actividad de CYP1A2 medida mediante el metabolismo de la cafeína está relacionada con el metabolismo de la Clozapina (Doude van Troostwijk et al., 2003; Özdemir et al., 2001a) .

Además de los factores ambientales, existen factores genéticos que pueden influir en la actividad del citocromo CYP1A2. El gen *CYP1A2* está situado en el brazo largo del cromosoma 15, en la región 15q24 y posee 7 exones, el primero de los cuales no es codificante. Al igual que ocurre con el resto de los CYPs, *CYP1A2* posee "alelos". Esto está reflejado en la clasificación alélica de los CYPs propuesta por el *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Comité* según la cual en *CYP1A2* se diferencian 16 alelos, presentando el alelo \*1 21 subtipos. De estos alelos destacan por su implicación en cambios de la actividad enzimática los alelos \*1C, \*1F, \*1K, \*7 y \*11. De ellos, es quizá el \*1F pueda ser el más interesante, puesto que varios estudios ha demostrado su implicación en el incremento de la inducibilidad del enzima ante factores como el tabaco, lo cual haría que un individuo fumador con este alelo poseyese un metabolismo equivalente al de un metabolizador Ultrarrápido (Eap et al., 2004).

Entre estos estudios de asociación contamos con el clásico de Sachse et al. de 1999, que apunta a la existencia de un incremento en el metabolismo de aproximadamente 1,6 veces en fumadores. Este incremento puede explicar la falta de respuesta ante antipsicóticos como la Clozapina y posiblemente la Olanzapina de ciertos pacientes. Varios estudios sobre casos (Eap et al., 2004, Özdemir et al. 2001b).

corroboran esta idea. Existen, sin embargo estudios que no encuentran una relación clara entre la presencia de este alelo y el incremento de la actividad metabólica sobre la Clozapina en fumadores. Dos estudios destacan entre sus conclusiones el hecho de no haber encontrado tal relación: Jan van der Weide y colaboradores. destacan en su estudio de 2003 que si bien el estatus de fumador sí

influye (se comparan 45 fumadores y 35 no fumadores) en el metabolismo de la Clozapina el efecto del genotipo de CYP1A2 sobre el mismo no parece tan claro y en todo caso parece diluirse con el efecto activador general del tabaco (Van der Weide et al., 2004). Sin embargo, este estudio tipa únicamente el polimorfismo -163 C>A del intrón 1 del gen. Este polimorfismo, cuya presencia en solitario define al alelo \*1F puede encontrarse como parte de otros haplotipos, entre ellos el \*1K o el \*1J, que se encuentran en población española con una frecuencia de un 1,3% y un 0,5% respectivamente. Los estudios de Aklillu y colaboradores realizados en 2003 sobre población etíope no muestran relevancia del alelo \*1F sobre la actividad del enzima (medida mediante cafeína) pero concluyen que las discrepancias con estudios anteriores pueden deberse a que los haplotipos no están definidos aún de forma completa mediante los polimorfismos analizados, pudiendo existir alguna variable no estudiada que interfiera en los resultados (Aklillu et al., 2003). Además la presencia de estas nuevas variables podría tener un elevado componente poblacional. En 2005 Soyama y colaboradores encontraron 7 nuevas combinaciones haplotípicas que contenían el SNP -163 C>A en población asiática: \*1L, \*1M, \*1N, \*1O, \*1P, \*1Q, \*1R (Soyama et al., 2005)

Curiosamente, estudios recientes realizados por Ghotbi et al. (en un equipo en el que también se encontraba Eleni Aklillu) comparando población sueca y coreana si detectan una asociación entre el alelo \*1F y una mayor actividad metabólica de CYP1A2 (medida de nuevo con métodos de fenotipado basados en cafeína) en fumadores de la población sueca, con una  $P=0,02$ . En este mismo estudio también encuentran el polimorfismo -163 en nuevas combinaciones haplotípicas, como \*1V y \*1W, alelos que aún están descritos como presuntos haplotipos, y sobre los que no existen aún estudios de actividad *in vitro* o *in vivo* (Ghotbi et al. 2007).

Los alelos \*1C, \*1K, \*7, \*11 poseen, por el contrario, una actividad enzimática por debajo de lo normal, con lo cual se espera que los pacientes que muestren estos alelos en homocigosis se comporten como pobres metabolizadores, mostrando efectos secundarios a dosis estándar.

### 6.3.2 GEN DEL CITOCROMO P450 2D6 (CYP2D6):

El gen *CYP2D6* pasa por ser el gen más estudiado en farmacogenética. Pasa por ser el primer enzima metabolizador de fármacos documentado como polimórfico (Tucker et al. 1977, Mahgoub et al., 1977, Eichelbaum et al., 1979). Su implicación en el metabolismo de la Debrisoquina hace que aún hoy se la denomine Debriso-

quina-4-hidroxilasa, y fue en este medicamento en el que se determinaron las primeras implicaciones farmacogenéticas de CYP2D6.

Si bien no participa en el metabolismo de tantos fármacos como los CYP3A, si metaboliza un gran número de ellos de gran importancia: analgésicos opioides (Codeína), antiarrítmicos, B-bloqueantes, numerosos antidepresivos (Amitriptilina, Citalopram, Fluoxetina, Fluvoxamina, Sertraline, etc...) (Rau et al., 2004, Thue-rauf et al., 2006) y varios antipsicóticos (Risperidona y Aripiprazol fundamentalmente).

*CYP2D6* está situado en el brazo largo del cromosoma 22, en la región 22q13 y posee nueve exones.

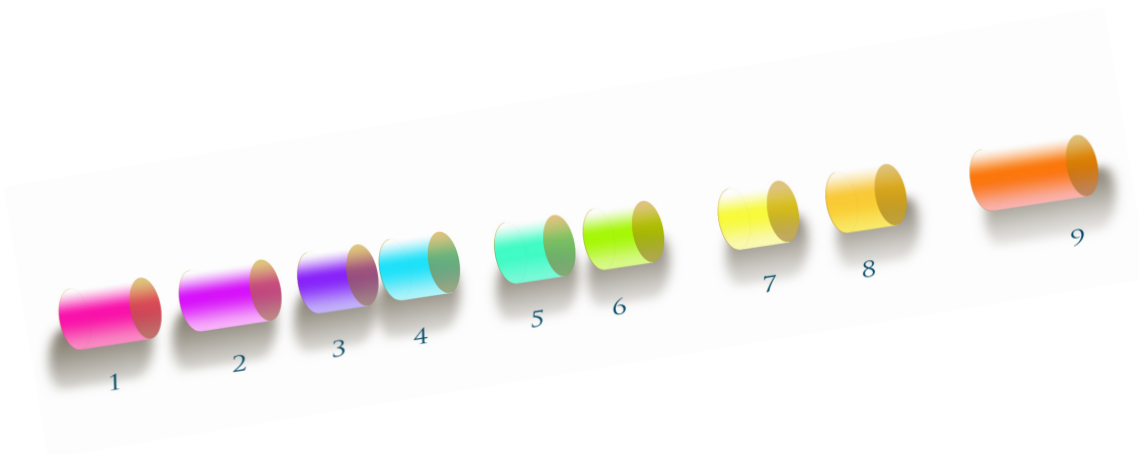


Figura 8: representación de los nueve exones de CYP2D6.

Es un gen altamente polimórfico, y al igual que otros CYPs existe una nomenclatura para sus combinaciones haplotípicas o alelos. En la actualidad hay descritos unos 63 alelos, algunos de los cuales pueden llegar a poseer hasta 13 subtipos, como ocurre con CYP2D6\*2. Se utiliza la misma nomenclatura que en el resto de los CYPs: un asterisco seguido de un número para el alelo y una letra mayúscula para el subtipo, de haberlo.

*CYP2D6* tiene una peculiaridad que lo hace interesante a nivel farmacogenético, y es que se puede predecir la actividad metabólica de un individuo según la combinación de los dos alelos que presente, partiendo del conocimiento de cómo influyen los polimorfismos que determinan los alelos en la actividad del enzima. Esto ocurre de forma similar en otros CYPs, sin embargo es en *CYP2D6* donde se ha estudiado más intensivamente y se ha encontrado una correlación casi perfecta entre

el genotipo y la actividad metabólica del enzima, diferenciando esta en cuatro escalas de fenotipos predictivos, dependiendo de la combinación de alelos presentes en un individuo:

- **Metabolización Extensiva:**

Los individuos que posean de una a dos copias activas del gen, tendrán un metabolismo normal. Evidentemente la mayor parte de la población muestra este genotipo.

- **Metabolización Intermedia:**

Es quizá la clase más discutida: existen grupos que denominan Metabolizadores Intermedios (IMs) a aquellos individuos con una copia inactiva y otra con actividad reducida, mientras otros reservan este término para aquellos con una única copia activa del gen (con lo cual los EMs serían aquellos con dos copias activas). Además, se cree que esta categoría posee interés únicamente a nivel experimental, ya que fenotípicamente los IM no parece que se distingan de los EM, con lo cual ambos fenotipos suelen agruparse cuando se realiza un genotipado orientado a la clínica.

- **Metabolización Deficiente:**

Aquellos individuos que no hayan heredado ninguna copia activa del gen, bien por que posean dos copias de un enzima defectivo con actividad disminuida, bien porque sólo posean una copia del gen (la otra copia estaría delecionada) y esta sea defectuosa o incluso porque carezca en absoluto del gen (ambas copias delecionadas, lo cual es sumamente raro), tienen un metabolismo más lento de lo normal y se denominan Pobres Metabolizadores (PM). Esta situación ocurre con una frecuencia estimada en caucasoides de un 15% e implica que, en el tratamiento con un fármaco metabolizado por este gen, a dosis normales, dicho fármaco tardará mucho tiempo en eliminarse, permaneciendo en el torrente sanguíneo sin ser metabolizado a una forma susceptible a ser excretada. Esto puede llevar a que el paciente experimente reacciones adversas (ADRs) similares a las de una intoxicación o sobredosis.

- **Metabolización Ultrarrápida:**

En el caso contrario al anterior, existe la posibilidad de que el individuo presente más de dos copias activas del gen. No todos los alelos parecen ser susceptibles de duplicación; se han detectado en los alelos \*1, \*2, \*4, \*10 y \*35 fundamentalmente (Dahl et al., 1995, Johanson et al., 1993, Lovlie et al., 1997, García-Barceló et al., 2000, Griese et al., 1998). De ellos, únicamente son activos los alelos \*1, \*2 y \*35, mientras que \*10 implica una actividad enzimática reducida y \*4 codifica un enzima totalmente inactiva.

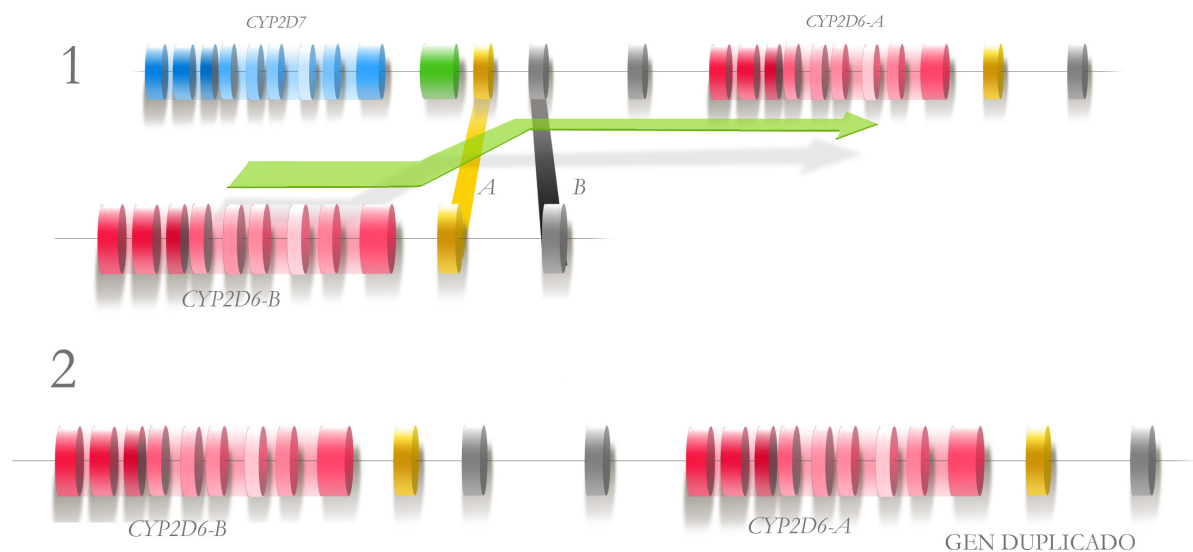


Figura 9: Representación gráfica del mecanismo de formación de alelos duplicados de CYP2D6 propuesto por Lundqvist et al. en 1999. 1: en azul CYP2D7, en rojo CYP2D6. A y B representan los dos posibles puntos de corte: Región repetitiva CCCACCCTG (en amarillo) y Secuencia Alu (en negro) respectivamente, 2: resultado, duplicación del gen CYP2D6.

Un individuo con más de dos copias de un alelo funcional, expresará mayor cantidad del enzima, lo cual incrementará el metabolismo de toda sustancia que utilice la vía del CYP2D6. A estos individuos se les denomina Metabolizadores Ultrarápidos (UM) y debido a que catalizan de forma mucho más efectiva la monooxidación del fármaco, este dispone de menos tiempo para ejercer su acción puesto que será degradado rápidamente. A dosis normales, un paciente UM tendrá una respuesta terapéutica mucho menor o ninguna en absoluto. Esto es especialmente importante en aquellos medicamentos cuya ventana terapéutica es muy estrecha (el rango de dosis a las cuales ejercen su acción es muy reducido).

Los mecanismos mediante los que un solo cromosoma puede tener 2, 3, 4, 5 o incluso hasta 13 copias del mismo gen tienen que ver con el hecho de que CYP2D6 se encuentra situado en lo que se conoce como locus CYP2D, en el cromosoma 22 (Dahl et al., 1995). Este locus está formado por el altamente polimórfico CYP2D6 y dos pseudogenes denominados CYP2D7 y CYP2D8 (Kimura et al., 1989). El pseudogén CYP2D7 tiene un grado de homología superior al 90% con CYP2D6.

Según el modelo propuesto (Lundqvist et al, 1999) , la duplicación tendría lugar debido a un reordenamiento causado por la presencia de una región en la zona "Downstream" de CYP2D7 que también estaría presente en la de CYP2D6. Exis-

ten dos regiones candidatas para explicar este proceso: una región repetitiva CCCACCCTTC y una secuencia ALU de 300 bps. Podría producirse un corte y unión entre ambas estructuras de ambos genes, lo cual generaría un alelo sin CYP2D6 y otro alelo con dos copias del mismo. El proceso mediante el cual se generan más de dos copias sería similar.

Además de la variabilidad genética, existen causas externas capaces de modificar la actividad metabólica de este gen: varios fármacos comunes presentan capacidad inhibidora de la actividad de CYP2D6, como la Fluoxetina o la Paroxetina. Así, individuos Metabolizadores Extensivos se comportarían fenotípicamente como Pobres Metabolizadores cuando existiese cotratamiento con estos fármacos, pudiendo desarrollar reacciones adversas a tratamientos que utilicen la vía del CYP2D6.

La implicación de CYP2D6 en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos atípicos se limita fundamentalmente a la Risperidona, en cuyo metabolismo es la enzima principal:

CYP2D6 está implicado la conversión de Risperidona a 9-Hidroxi-risperidona, y se ha constatado que los PMs presentan concentraciones altas del primero y bajas del segundo. Inicialmente se pensaba que ambos metabolitos eran activos a nivel de receptor, con lo que inicialmente se creyó que ni el estatus metabolizador de CYP2D6 definido por sus variantes alélicas, ni la introducción de fármacos inhibidores de esta enzima tendrían efecto sobre la efectividad de la Risperidona. De hecho las indicaciones de la casa comercial responsable de este medicamento desechan la posibilidad de variar la dosis según el estatus metabolizador de CYP2D6: los estudios realizados por la casa comercial de este medicamento, realizados con un número muy bajo de pacientes (2 PMs y 9 EMs) indicaban que no existía apenas implicación del fenotipo predicho a partir de la combinación de los alelos de CYP2D6 y su fenotipo a nivel de respuesta.

Posteriormente se comprobó que existía una fuerte correlación entre el genotipo de CYP2D6 y la respuesta a la Risperidona. Bork y colaboradores comprobaron en un estudio preliminar, de tipo caso-control, realizado en 1999 la implicación de este gen en el metabolismo de este antipsicótico, de forma que los pacientes PMs presentaban ADRs moderados a graves en un 100% de los casos, mientras que únicamente un 35% de los EMs se enfrentaba a estos efectos (Bork et al., 1999). Este estudio dio pie a otro más ambicioso y mucho más amplio, realizado en 2004 por José de León con 554 pacientes tratados con Risperidona, en el que se determinó que sí existía una correlación importante entre la aparición de efectos secundarios adversos y el hecho de ser genotípicamente Pobre Metabolizador. De hecho se de-

terminó que los PMs poseían un riesgo superior a tres veces mayor de desarrollar efectos adversos que los individuos EMs o IMs. Además este estudio concluía que el efecto de ser PM estaba estadísticamente ligado a la pérdida de adherencia al tratamiento, de forma que los PMs tenían seis veces más probabilidades de abandonar ese tratamiento que los EMs (De Leon et al., 2005).

Otro punto que parecía obvio, una vez demostrada la implicación de CYP2D6 en el metabolismo de la Risperidona, y de las variantes alélicas PMs en la aparición de efectos secundarios, era el papel de las duplicaciones génicas en la respuesta a este fármaco. Si una metabolización deficiente de CYP2D6 implicaba un incremento en la toxicidad del tratamiento, era lógico pensar que el incremento de actividad metabólica presente en los Metabolizadores Ultrarrápidos, ya demostrada mediante medidas del ratio Debrisoquina / 4-hidroxi-Debrisoquina (que se suele usar como método de fenotipado de la capacidad metabólica de CYP2D6) implicaría una peor respuesta al tratamiento. Este punto fue corroborado por numerosos estudios de tipo caso-control (Guzey et al., 2000; Albrecht et al., 2004).

Curiosamente la relación entre genotipo UM y fenotipo UM no es bidireccional, es decir: si bien los individuos cuyo genotipo muestra un incremento en el número de copias del gen *CYP2D6* si presentan un fenotipo Metabolizador Ultrarrápido, no todos los individuos cuyo fenotipo es claramente Ultrarrápido presentan un genotipo equivalente. El estado de conocimiento farmacogenético y los métodos de genotipado utilizados en la actualidad sólo permiten detectar un 20% aproximadamente de los Metabolizadores Ultrarrápido, y se cree que deben existir otros polimorfismos o modificaciones genéticas a nivel de *CYP2D6* que expliquen el 80% restante (Bregman et al., 2001). Este factor es posiblemente uno de los que influyen en el amplio rango de respuestas que podemos encontrar en aquellos individuos cuyo genotipo indica que su metabolismo es normal y debe tenerse en cuenta a la hora de un diseño farmacogenético.

El genotipado de CYP2D6 como predictor de respuesta a Risperidona ya se está utilizando en varios hospitales tanto en EEUU como en Europa. Además la FDA aprobó en enero de 2005 el primer test farmacogenético para uso clínico, el Ampli-chip P450 de Roche, que permite el genotipado de la mayoría de los alelos de CYP2D6.

Otro antipsicótico atípico de relativamente reciente aparición, el Aripiprazol, incluye en su guía de aplicación la advertencia de que, al igual que la Risperidona, es metabolizado por CYP2D6 y que existe la posibilidad de poseer un metabolismo

alterado a nivel genético. Esta advertencia supone realmente la primera recomendación de análisis farmacogenético previo al tratamiento en antipsicóticos.

### 6.3.3 GENES DE LA FAMILIA DEL CITOCROMO P450 3A (CYP3A): CYP3A4 Y CYP3A5.

La familia 3A del complejo de los citocromos P450 está implicada en el metabolismo de un 45-60% de todos los medicamentos conocidos (ver *Figura 7*), desde inmunosupresores hasta bloqueantes de los canales de calcio. Cataliza reacciones de oxidación, peroxidación y reducción. Además está implicada en el metabolismo de sustratos endógenos como los estrógenos. Como ocurre en otros CYPs, esta familia presenta en su expresión una enorme variabilidad tanto poblacional como a nivel interindividual, variabilidad que puede superar el 25%.

A nivel hepático, en el adulto, su isoforma principal es CYP3A4 (y supone un 30% de todos los CYPs en éste órgano), y la secundaria CYP3A5, que también aparecen en la mucosa intestinal. Ambas isoformas comparten sustratos y posiblemente metabolizan las mismas reacciones, pese a que CYP3A5 no se expresa más que en 1/3 de los individuos caucásicos.

Los genes *CYP3A4* y *CYP3A5* se encuentran en tándem en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q21 – q22.1.

La familia CYP3A es la responsable del metabolismo de dos antipsicóticos atípicos frecuentemente utilizados en el tratamiento de las psicosis, especialmente en esquizofrenia: la Quetiapina y la Ziprasidona (Gunasekara et al., 1998, Prakash et al., 2000). También es posible que actúe como enzima alternativo en el metabolismo de otros fármacos como la Risperidona (Bork et al., 1999).

#### a) CYP3A4

Históricamente se ha considerado que la isoforma CYP3A4 era la predominante a nivel hepático y responsable, por tanto de la elevada variabilidad interindividual en el metabolismo y aclaración de los numerosos fármacos que utilizan la vía CYP3A, y por ello es uno de los CYPs más estudiados. Se ha estimado que teóricamente un 60-90% de la variabilidad interindividual de la actividad de CYP3A4 a nivel hepático se debe a variabilidad a nivel genético (Ozdemir et al., 2000). Sin embargo, los estudios de frecuencias alélicas de los SNPs de este gen, así como los

estudios realizados con respecto a su funcionalidad no muestran una variabilidad equivalente, con lo cual se estima existan otros mecanismos de variabilidad genética como fenómenos de epigenéticos u otras variables haplotípicas aún no descritas (Wandel et al., 2000).

Existe una variable alélica interesante debido a que causa una disminución de la actividad enzimática: el alelo \*17. El \*18A, codifica, sin embargo, una enzima con una actividad superior a la normal. Ambos están definidos por SNPs no sinónimos. El alelo salvaje \*1 confiere al enzima una actividad normal (Dai et al., 2001).

El CYP3A4 es el responsable principal de la biotransformación de fármacos antipsicóticos como Ziprasidona o Quetiapina y se ha probado que la co-administración de inhibidores (ketoconazol) / inductores (carbamazepina, fenitoina, rifampicina) de CYP3A4 provoca una modificación considerable de la acción de la Ziprasidona mediante el incremento o disminución de su aclaramiento hepático (FDA, 2000).

## b) CYP3A5

La mayor parte de los estudios sobre CYP3A se han basado tradicionalmente en CYP3A4 como isozima principal a nivel hepático, debido a que la expresión de CYP3A5 no es común entre caucasoides. Los estudios poblacionales indican que CYP3A5 sólo es detectable a nivel hepático en un 33% de los caucasoides norteamericanos, mientras que se expresa en un 60% de los afroamericanos (Kuehl et al., 2001). Sin embargo, se ha demostrado que, en aquellos individuos en los que se expresa CYP3A5 a nivel hepático, éste tiene tanta actividad metabólica como CYP3A4, con lo que se cree que podría intervenir en la alta variabilidad en la respuesta a fármacos mediados por la familia CYP3A.

La Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Comité define, al igual que ocurre con el resto de CYPs relevantes una serie de alelos en función de la presencia de variaciones con respecto a un alelo salvaje o alelo \*1. Los experimentos de Kuehl y colaboradores realizados en 2001 indican que sólo aquellos individuos que portan el alelo \*1 producen altas cantidades de mRNA completo y expresan CYP3A5 en su hígado, mientras que los dos alelos defectivos descritos por Kuehl, \*3 y \*6 (ambos caracterizados por sendas mutaciones causantes de un defecto en el *splicing*), serían los responsables de la falta de CYP3A5 funcional. Así, se ha demostrado que en los portadores del alelo CYP3A5\*1, CYP3A5 representaría aproximadamente el 50% del total de proteína CYP3A. Un estudio realizado por Guillermo Gervasini y colaboradores indica que

en la población española, el porcentaje de homocigotos para el alelo \*1 es de un 2,8 % en la población española, mientras que la frecuencia del alelo es de un 20,2 % (Gervasini et al., 2005). Esto confiere al genotipado de CYP3A5 una importancia que anteriormente se reservaba de forma exclusiva a CYP3A4.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos aquí enumerados son resultado de una evolución temporal y tecnológica. Para la realización de este estudio se han utilizado técnicas de genotipado de baja capacidad como la secuenciación directa, el análisis de fragmentos o el SNaPshot® y métodos de alta capacidad como el Sequenom®.

Se han utilizado también técnicas no desarrolladas en nuestro laboratorio como el Amplichip P450 de Roche basado en la plataforma de chips para genotipado de Affymetrix. Parte de este análisis fue realizado en los laboratorios de Progenika en Vizcaya.

Las muestras de DNA utilizadas fueron extraídas a partir de sangre total mediante el Wizard DNA Extraction Kit de Promega, salvo que se indique lo contrario. Tanto los pacientes analizados como los individuos sanos han dado su conformidad mediante un consentimiento informado.

### 1. ANÁLISIS DE CYP2D6 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA

Alelo	100	124	138	883	1661	1707	1758	1846	2549	2850	2935	4180
*1	C	G	G	G	G	T	G	G	A	C	A	G
*2	C	G	G	G	C	T	G	G	A	T	A	C
*3	C	G	G	G	G	T	G	G	del	C	A	G
*4	T	G	G	G	C/G	T	G	A	A	C	A	C
*5	CYP2D6 deletado											
*6	C	G	G	G	G	del	G	G	A	C	A	G
*7	C	G	G	G	G	T	G	G	A	C	C	G
*8	C	G	G	G	C	T	T	G	A	T	A	C
*9	(A2701-A2703) o (G2702-A2704) deletados											
*10	T	G	G	G	C	T	G	G	A	C	A	C
*11	C	G	G	C	C	T	G	G	A	T	A	C
*12	C	A	G	G	C	T	G	G	A	T	A	C
*14	T	G	G	G	G	T	A	G	A	T	A	C
*15	C	G	ins T	G	G	T	G	G	A	C	A	G

Tabla 3: SNPs tipados mediante secuenciación directa y Alelos que los contienen.

El protocolo propuesto para el genotipado de doce variables polimórficas de *CYP2D6* (ver tabla 3) mediante secuenciación directa supone los siguientes pasos:

- 1.1 Amplificación por PCR del gen completo.
- 1.2 PCR de los fragmentos de interés.
- 1.3 Secuenciación de los fragmentos de interés (C1, C2, C3, C4, SNP1 y SNP2)

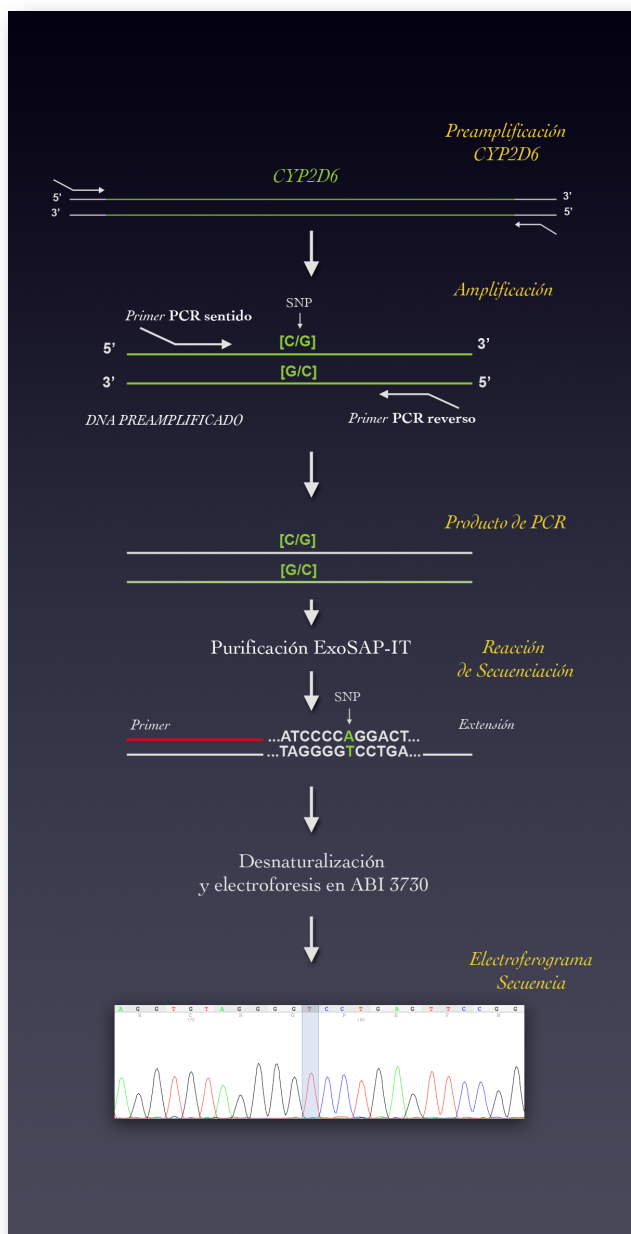


Figura 10: Flujo de trabajo del genotipado de *CYP2D6* por secuenciación directa

A continuación se especifican los procedimientos utilizados para cada uno de estos pasos:

### 1.1 Amplificación por PCR del gen completo:

Las condiciones y *primers* utilizados para la amplificación del gen *CYP2D6* están basadas en las utilizadas por Müller et al. en 2003. El protocolo original estaba diseñado para ser utilizado en PCR en tiempo real mediante la tecnología Lightcycler; así pues, hubo de ser modificado para su uso en un termociclador convencional (ver tablas 4-5).

Debido a la longitud del fragmento amplificado (4,7 Kb) se utilizó la *Expand Long Template PCR System* (Roche) y un protocolo de PCR larga con un incremento de tiempo de annealing por ciclo (ver Tabla 5). La temperatura de annealing fue determinada en 62°C realizando una PCR en gradiente de temperatura en un termociclador de placas Dyad (*DNA Engine Peltier Dyad Thermal Cycler*, Bio Rad). La reacción se realizó en placas de 96 pocillos (Microamp<sup>TM</sup> Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) según las condiciones descritas en la tabla 5 y utilizando

do los *primers* descritos en la tabla 4.

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
C2D6-F	GGTAAGGGCCTGGAGCAGGAA	21
C2D6-R	GCCTCAACGTACCCCTGTCTC	21

Secuencia de Referencia Genebank: M55588

Tabla 4: Primers utilizados para la amplificación por PCR del gen CYP2D6.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX 1		MIX 2		Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O (MQ)	6µl	H <sub>2</sub> O (MQ)	9,625µl	93°	2 minutos	
dNTPs (5mM)	3,5µl	Buffer	2,5µl	93°	10 segundos	
CYP2D6-F	1µl	TAq Expand	0,375µl	62°	30 segundos	x10
CYP2D6-R	1µl			68°	4 minutos	
				93°	15 segundos	
				62°	30 segundos	x20
TOTAL	11,5µl	TOTAL	12,5µl	68°	4 minutos*	
				68°	7 minutos	

DNA: 2µl

\* (+20 segundos por ciclo)

Tabla 5: Condiciones de PCR para la amplificación del gen CYP2D6

1.2 PCR de los fragmentos de interés:

Tras la amplificación del gen completo se amplificaron seis fragmentos de entre 200 y 500 pares de bases que posteriormente fueron secuenciados. Estos fragmentos debían contener en su interior los polimorfismos de interés, alejados de los extremos debido a la dificultad de lectura derivada de la amplificación deficiente de estas regiones.

Los *primers* fueron diseñados utilizando el programa “online” Primer3, que calcula los posibles *primers* de una secuencia dada, habiendo definido las condiciones de temperatura, y tamaño que nos interesen. Normalmente los *primers* deben tener una longitud de 18-20 bases, lo cual minimiza las probabilidades de que se unan inespecíficamente a otras zonas del genoma. En este caso se buscó que la temperatura de annealing fuese la misma para todos los *primers*, lo cual nos permitió usar la misma reacción de PCR para amplificar los seis fragmentos, disminuyendo así el tiempo empleado en esta parte de la técnica. Una vez obtenidos los distintos *primers* posibles, se analizó su especificidad por el fragmento de interés realizando una comparación de su secuencia con las contenidas en las bases de datos genómicas. Esto se realizó mediante la herramienta Blast del “National Center of Biotechnology

*Information*", NCBI. Para llevar a cabo esta reacción se utilizó la Taq Polimerasa de la casa Promega según las condiciones descritas en la *Tabla 7* y utilizando los *primers* enumerados en la *Tabla 6*.

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
C1-F	TTGGTAGTGAGGCAGGTATGG	21
C1-R	CCTGGTCGAAGCAGTATGGTGT	22
C2-F	GTGGGGCTAATGCCTTCAT	19
C2-R	AAGCGAGGGTCGTCGTAC	18
C3-F	CTTCCAAAAGGCTTTCCTGAC	21
C3-R	GATGCACTGGTCCAACCTTTT	21
C4-F	GTTCTGTCCCGAGTATGCTCTC	22
C4-R	CTCCTATGTTGGAGGAGGTCAG	22
SNP1-F	TCGTCCAAGGTTCAAATAGGA	21
SNP1-R	CCCATTGAGCACGACCAC	18
SNP2-F	TCTTCCTCTTCTTCACCTCCC	21
SNP2-R	AGGCTGGGGACTAGGTACCCC	21

Tabla 6: *Primers* utilizados para la amplificación por PCR de los fragmentos de interés.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX PCR		Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O (MQ)	12,75µl	94°	3 minutos	x35
Buffer 10x	2,5µl	94°	30 segundos	
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1,5µl	60°	30 segundos	
dNTPs (5mM)	4µl	72°	30 segundos	
Primer-F	1µl	72°	7 minutos	
Primer-R	1µl			
TAq	0,75µl			
DNA:	2µl			

Tabla 7: *Condiciones de PCR* para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de *CYP1A2* mediante secuenciación directa

### 1.3 Secuenciación de los fragmentos de interés (C1, C2, C3, C4, SNP1 y SNP2):

#### 1.3.1 Comprobación de la PCR

Tras la reacción de amplificación de los fragmentos de CYP2D6 que contienen aquellos SNPs de interés, se procedió a comprobar su integridad y tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa, con el fin de determinar la eficiencia de la PCR y como control previo a la secuenciación. Esta electroforesis fue realizada utilizando geles comerciales en un sistema *Ready-to-Run Separation Unit* (Amersham Pharmacia Biotech) que permiten una determinación mediante una electroforesis de 5 minutos.

#### 1.3.2 Purificación de producto de PCR

Como paso previo a la secuenciación debe procederse a una purificación del producto de PCR con el fin de eliminar restos de *primer* y nucleótidos que no han sido utilizados por la reacción y que podrían interferir en la lectura de la secuencia. Para eso se utiliza una mezcla comercial de Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Camarón en un buffer especial, conocida como ExoSAP-IT (USB). La Exonucleasa se encarga de digerir las cadenas sencillas de DNA: *primer* y cadenas residuales de la PCR, mientras que la Fosfatasa Alcalina se ocupa de eliminar los dNTPs remanentes.

La reacción consiste en añadir 0,85µl de ExoSAP-IT a 2,15µl de producto de PCR e incubar a 37°C durante 15 minutos. A esta temperatura ambas enzimas son activas y realizarán su función. Tras los 15 minutos deberá inactivarse la mezcla enzimática incrementando la temperatura de la reacción a 80°C durante otros 15 minutos. Si se omitiese este paso correríamos el riesgo de degradar el producto de PCR.

Esta reacción de purificación se realizó en un termociclador Dyad (DNA Engine Peltier Thermal Cycler de Bio-Rad) y en placas de 96 pocillos.

#### 1.3.3 Secuenciación del producto purificado.

En este caso se ha utilizado un kit comercial, el “ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase”, optimizado para la lectura de las secuencias mediante el secuenciador automático ABI 3730-XL (Applied Biosystems). Este Kit consiste en una mix que contiene los deo-

xinucleótidos trifosfato, los dideoxinucleótidos trifosfato, Cloruro Magnésico ( $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ), un buffer y una AmpliTaq DNA Polimerasa, una variante mutada de la DNA Polimerasa de *Thermus aquaticus* que carece de actividad nucleasa 5'-3' y que no distingue entre nucleótidos deoxi y dideoxi.

Como *primer* se utiliza uno de los diseñados para la reacción de PCR. En este caso hemos realizado la reacción de secuenciación por duplicado, usando el *primer* "Forward" y el *primer* "Reverse", con el fin de tipar correctamente aquellas posiciones situadas en los extremos de la secuencia, regiones en las que suelen existir dificultades de lectura, e incrementar la fiabilidad del genotipado.

La reacción de secuenciación se realizó en placas de 96 pocillos en un termociclador de placas Dyad de 96 pocillos, siguiendo el protocolo establecido en el kit, un protocolo estándar (ver *Tabla 8*)

#### CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

MIX DE SECUENCIACIÓN		Temperatura	Tiempo	
Mix Kit Seq.	0,5µl	96°	3 minutos	x25
Buffer 5x	2,5µl	96°	30 segundos	
H <sub>2</sub> O (MQ)	7µl	50°	15 segundos	
<i>Primer</i> (F o R)	0,5µl	60°	4 minutos	
Producto de PCR Purif.	1µl			

*Tabla 8: Condiciones utilizadas para la reacción de secuencia.*

### 1.3.4 Purificación del producto de secuenciación:

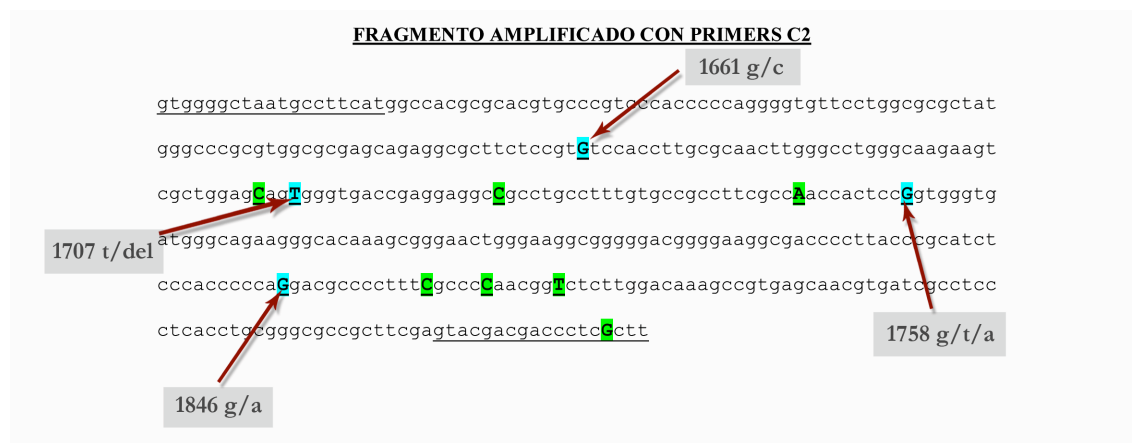
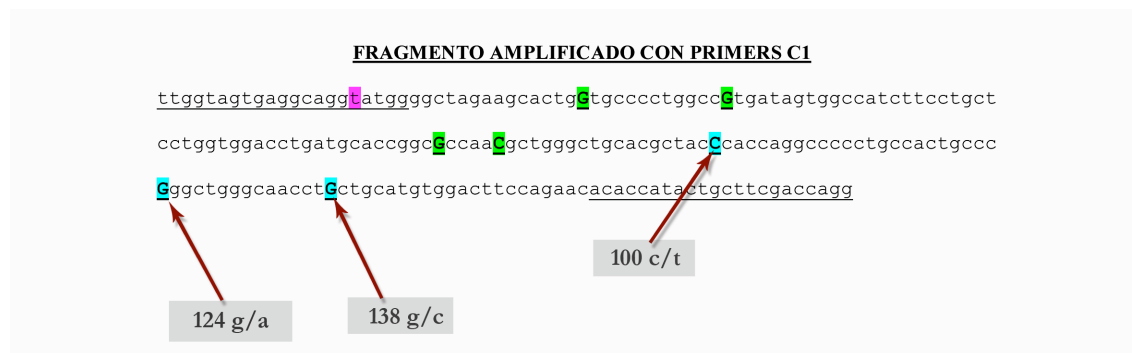
Como paso previo a la introducción de los productos en el secuenciador es necesario purificar los productos con el fin de eliminar todo remanente de la reacción de secuenciación que no sean los fragmentos marcados.

Esta purificación se realizó mediante un sistema de filtrado por vacío siguiendo un protocolo optimizado. Todo el proceso se realiza en placas de 96 pocillos (Montage<sup>TM</sup> Seq96, 96 Well de Millipore) Partimos de la placa utilizada para la reacción de secuencia, en cuyos pocillos se añade, mediante una pipeta multicanal, 20µl de una solución de inyección. Tras agitar ligeramente se transfiere el producto con el buffer a una placa especial que dispone de una membrana porosa (Seq96). Apli-

cando vacío (23 mb) hasta que se retira todo el líquido de la placa, obtenemos el producto de secuencia adherido a la membrana, mientras que los nucleótidos sueltos pasarán a través de la misma. Este proceso se realiza de nuevo añadiendo 25 µl de solución de inyección. Finalmente, con el fin de desprender el producto de secuenciación de la membrana, se realiza un proceso de lavado por agitación de la placa con 20 µl de tampón de lavado y se transfiere a placas específicas de 96 pocillos (Microamp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems).

### 1.3.5 Lectura de secuencias:

Los productos fueron analizados mediante un protocolo de electroforesis específico de secuenciación en un secuenciador automático de 96 capilares ABI 3730-XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Para la detección de los SNPs de interés se utilizó el paquete Staden Package v1.6.0.



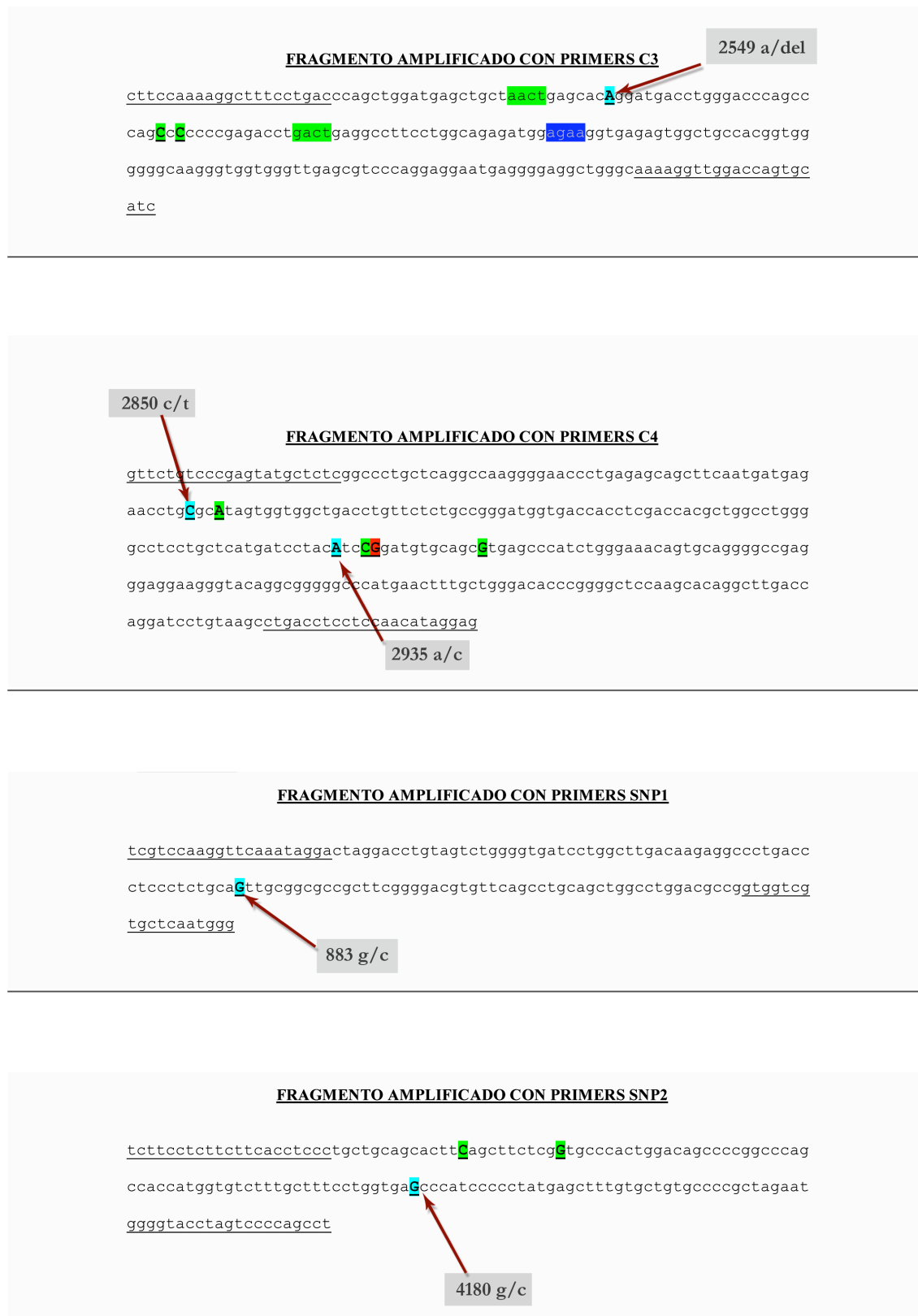


Figura 11: Secuencias de los fragmentos de CYP2D6 amplificados y secuenciados, con las posiciones polimórficas a tipar marcadas. Las regiones de unión de los primers de PCR-Secuenciación utilizados se encuentran subrayadas.

## 2. DETECCIÓN DE LA DUPLICACIÓN Y DELECIÓN GÉNICA.

Para la detección de la Duplicación de CYP2D6 se utilizó la técnica desarrollada por Steijns et Al. en 1998. En este caso se utiliza una PCR mediante *primers* complementarios a la región intergénica de CYP2D7-CYP2D6. Estos *primers*, amplifican la región entre los dos genes CYP2D6 de los alelos duplicados generando un fragmento de 3,6 Kb, pero también la región intergénica CYP2D7-CYP2D6 de 5, 2 Kb tanto en los alelos normales como en los duplicados. La reacción de PCR se llevó a cabo mediante los *primers* enumerados en la *Tabla 9*, utilizando las condiciones descritas en la *Tabla 10*, en un termociclador Dyad.

### PRIMERS PARA LA DETECCIÓN DE ALELOS DUPLICADOS DE CYP2D6

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
cyp-17f	TCCCCCACTGACCCAACTCT	20
cyp-32r	CACGTGCAGGGCACCTAGAT	20

Secuencia de Referencia Genebank: M53588

Tabla 9: Primers utilizados para la detección de duplicaciones en CYP2D6 mediante PCR y análisis de fragmentos.

### CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX 1		MIX 2	
H <sub>2</sub> O (MQ)	6µl	H <sub>2</sub> O (MQ)	9,625µl
dNTPs (5mM)	3,5µl	Buffer	2,5µl
CYP2D6-F	1µl	TAq Expand	0,375µl
CYP2D6-R	1µl		
TOTAL	11,5µl	TOTAL	12,5µl

DNA: 2µl

Temperatura	Tiempo	
93°	2 minutos	
93°	10 segundos	x10
62°	30 segundos	
68°	4 minutos	
93°	15 segundos	x20
62°	30 segundos	
68°	4 minutos*	
68°	7 minutos	

\* (+20 segundos por ciclo)

Tabla 10: Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los fragmentos para la determinación de duplicaciones.

El protocolo seguido para la detección de los alelos delecionados, \*5 fue una modificación del propuesto por Müller et Al. en 2003, adaptado para termocicladores normales. Así se amplifica un fragmento de 3,2 Kb en el caso de que exista algún alelo delecionado, fragmento que no aparece si se presentan ambos alelos. Las

condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas para la detección de la duplicación (ver *Tabla 10*) pero utilizando los *primers* descritos en la *Tabla 11*.

*PRIMERS PARA LA DETECCIÓN DE ALELOS DELEACIONADOS DE CYP2D6*

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
Del-F	ACCGGGCACCTGTACTCCTCA	21
Del-R	GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC	22

*Tabla 11. Primers utilizados para la detección de deleciones en CYP2D6 mediante PCR y análisis de fragmentos.*

La comprobación de los productos de PCR se realizó originalmente por electroforesis mediante el sistema de geles de agarosa *Ready to Run*. Lamentablemente no es un sistema que permita distinguir correctamente este tipo de fragmentos. Finalmente se utilizó un sistema de detección en electroforesis por capilares Agilent 2100 Bioanalyzer, que analiza los fragmentos mediante lectura por láser y para el que no es necesaria la tinción o el marcado de los fragmentos. La visualización de los productos se realiza mediante el programa del sistema, que genera tanto una imagen tipo “gel” como un electroferograma (ver *Figura 18*). Este sistema permite distinguir perfectamente los dos fragmentos posibles en la duplicación: el de 3,6 Kb y el de 5,2 Kb y el específico de la deleción, de 3,2 Kb.

### 3. GENOTIPADO DE CYP2D6 MEDIANTE AMPLICHIP P450:

#### Fundamentos de la Técnica:

El sistema del Amplichip se basa en los siguientes pasos:

- 3.1 Obtención de muestra a partir de sangre total
- 3.2 Amplificación de los genes y regiones específicas.
- 3.3 Fragmentación y marcado de los productos amplificados.
- 3.4 Hibridación en microarray y tinción.
- 3.5 Escaneado del microarray.
- 3.6 Determinación de los genotipos y fenotipos predichos.

A continuación se especifican las condiciones utilizadas para cada uno de los pasos:

### 3.1 Obtención de DNA a partir de sangre total:

Una de las mayores limitaciones del método empleado por el Amplichip es la necesidad de una muestra de calidad, debido a que deben realizarse amplificaciones de fragmentos de gran tamaño. Por ello el DNA debe estar en condiciones óptimas, fundamentalmente en lo que respecta a su integridad. El protocolo de Roche es bastante estricto al respecto e indica que la extracción de DNA sólo podrá llevarse a cabo a partir de sangre total (de 200µl) extraída en fechas previas al análisis (nunca congelada), mediante el Kit de extracción de Qiagen (QIAMP). Son necesarios unos 60 µl de DNA a una concentración de 2 ng/µl (para lo cuál habrá de diluirse la muestra con LOW EDTA TE) y con una pureza (ratio de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ ) de entre 1,50 y 1,85

Extracción de DNA para Amplichip P450	
1.-	Se parte de 200 µl de Sangre total
2.-	Se añaden 20 µl de PROTEASA y se mezcla
3.-	Se añaden 200 µl de BUFFER AL
4.-	VORTEX y SPIN
5.-	Incubar a 56° C durante 10 min.
6.-	CENTRIFUGAR para eliminar gotas.
7.-	Añadir 200 µl de ETANOL (96-100%)
8.-	VORTEX y SPIN
9.-	Depositar en la COLUMNA
10.-	CENTRIFUGAR 1 min a 8000 rpm. y descartar el tubo colector.
11.-	Depositar la columna en otro tubo y añadir 500 µl de BUFFER AW1
12.-	CENTRIFUGAR 1 min a 8000 rpm. y descartar el tubo colector.
13.-	Depositar la columna en otro tubo y añadir 500 µl de BUFFER AW2
14.-	CENTRIFUGAR a máxima velocidad (14.000 rpm.) 3 min y descartar el tubo colector.
15.-	(opcional) Depositar la columna en otro tubo y centrifugar de nuevo a 14.000 rpm./1 min
16.-	Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y añadir 200 (o 100) µl de Buffer AE o H <sub>2</sub> O.
17.-	Incubar 1 min a temperatura ambiente (15-25°C). Si se incuba más tiempo se incrementa la concentración.
18.-	CENTRIFUGAR 1 min a 8000 rpm.
Condiciones de las muestras de DNA:	
•	La concentración idónea para el AMPLICHIP es de 2 ng/µl, con lo cuál seguramente habrá que diluir la muestra. Esto debe hacerse usando una solución de Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM. (LOW EDTA TE).
•	La pureza (ratio $A_{260}/A_{280}$ ) debe estar entre 1,50 y 1,85.
Usaremos unos 60 µl de muestra en la PCR del Amplichip	

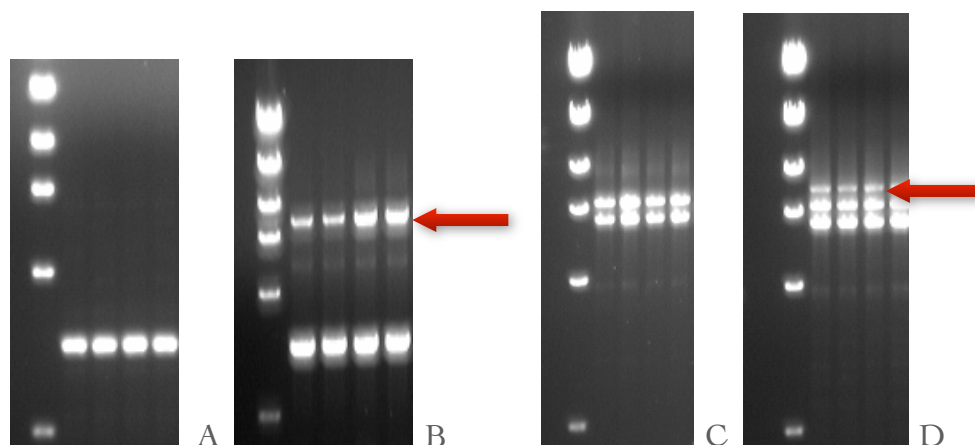
Tabla 12: Protocolo de Extracción con el Kit de Qiagen (QIAMP) necesario para genotipado con el Amplichip CYP450:

### 3.2 Amplificación por PCR

En reacciones *multiplex* separadas se realiza la amplificación de varios fragmentos de los dos genes que se tipan mediante al Amplichip: *CYP2D6* (PCR A) y *CYP2C19* (PCR B). El kit ya dispone tanto de los *primer* como de los buffers nece-

sarios. Para cada reacción se usa una mezcla de *primer*: para *CYP2D6* se amplificará de forma específica el gen completo (evitando así la contaminación con el pseudogén), de ahí la necesidad de una alta integridad y pureza del DNA, así como un fragmento del promotor (que contiene el polimorfismo -1584C>G). Además se amplifica un fragmento específico de la **duplicación** (de una forma similar al método descrito anteriormente desarrollado por Lundqvist et al. (*Gene* 226 (1999) *Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes*)) y uno específico de la **delección** (este se amplifica en la reacción de amplificación de *CYP2C19* PCR B).

Tanto para la PCR A como para la PCR B se utiliza el mismo protocolo de amplificación: se trata de una PCR larga que, según especificaciones de Roche, debe realizarse en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 de placa de oro. Los productos de PCR pueden ser chequeados en un gel de agarosa al 0,8%, con el fin de comprobar si las amplificaciones han sido correctas (ver *Figura 12*). El kit utiliza Taq Gold y contiene una enzima que garantiza la pureza de la amplificación, la Amperasa (Uracil N-Glicosilasa) que, activa únicamente en el paso previo a la amplificación, actúa sobre los amplicones inespecíficos que se hayan podido formar previamente y que llevan deoxiuridina (dUTP) a diferencia del DNA de origen. Con esto se garantiza la selectividad de la PCR del DNA objetivo.



*Figura 12: A y B: Electroforesis en Agarosa del producto de PCR B (*CYP2C19* y Delección de *CYP2D6*). Señalado el producto específico de la Delección; C y D: Electroforesis en Agarosa del producto de PCR A (*CYP2D6* y Duplicación de *CYP2D6*). Señalado el producto específico de la Duplicación. Imágenes cedidas por Roche.*

### 3.3 Fragmentación y Marcado de los productos de PCR

Los productos de la PCR anterior son combinados en un mismo tubo de reacción para la **fragmentación**, una reacción en la cual, mediante una DNAsa I se rompen los amplicones en fragmentos de entre 50 y 200 nucleótidos idóneos para el posterior marcado con biotina y su tinción e hibridación en el chip. En la reacción de **marcado** se añadirá biotina en el extremo 3' de los fragmentos, gracias a un reactivo específico del kit (TdT Amplichip) y a una Transferasa Terminal recombinante. Además, por acción de una Fosfatasa Alcalina, se eliminarán los dNTPs sobrantes de la reacción anterior.

Reacción de Fragmentación	
25°C	20 min
95°C	10 min
4°C	∞

Reacción de Marcado	
37°C	35 min
95°C	5 min
4°C	∞

Tabla 13: Condiciones de las reacciones de Fragmentación y Marcado. Estas reacciones se realizaron en un termociclador ABI 9700 de placa de oro.

### 3.4 Hibridación y Tinción del *array*

Los *arrays* o chips son soportes comerciales que disponen de hasta 15.000 sondas diferentes sobre una superficie de vidrio. Estas sondas se disponen ordenadas en celdas, cada una de las cuales posee millones de copias de la sonda en cuestión, de forma que los fragmentos homólogos a la sonda (hay sondas para el genotipo “salvaje” del polimorfismo y para el genotipo “mutante”) serán hibridados de forma específica durante la **etapa de hibridación**. Además, el tampón utilizado contiene oligonucleótidos “control”, que servirán para determinar si la hibridación ha sido correcta (Oligos B1). Posteriormente se realiza una **tinción** del microarray mediante un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, un colorante fluorescente que permitirá “leer” al escáner cuáles son las regiones (celdas) hibridadas y cuáles no. Tras la tinción se realiza un lavado para eliminar el exceso de colorante.

Todo este proceso se realiza en la “Estación de Fluidos” y está totalmente automatizada. Sólo deberán prepararse las soluciones de hibridación, tinción y lavado según el protocolo estándar proporcionado por Roche, que son bastante perecederas y hay que prepararlas en el momento, e iniciar el protocolo de fluidos.

### 3.5 Lectura del *microarray*

La plataforma de Affymetrix usada en el genotipado mediante el Amplichip posee un escáner de *microarrays* GeneChip Scanner 3000Dx, con una unidad autoloader de forma que se pueden escanear hasta 48 chips consecutivos, pese a que la estación de fluidos tiene capacidad para realizar la hibridación y tinción de 4 chips de cada vez. Los chips pueden ser almacenados en nevera tras su hibridación, tinción y lavado. Este escáner utiliza un láser para excitar el marcaje fluorescente de los fragmentos hibridados emitiendo luz de forma proporcional a la cantidad de DNA fijado en cada celda. De esta forma, se genera una imagen que será analizada posteriormente y en la cual existen puntos de alta intensidad lumínica allí dónde ha habido hibridación y de baja o nula intensidad dónde no la ha habido. Esta imagen no puede ser analizada visualmente debido a la cantidad de celdas existentes en cada chip (unas 15.000) y será tratada mediante un programa especial diseñado por Roche que identificará el genotipo de cada uno de los polimorfismos en función de la hibridación con la sonda correspondiente, bien sea “salvaje”, bien sea “mutante”.

### 3.6 Determinación de los genotipos y fenotipos predichos.

Otro programa específico utiliza la información obtenida del análisis de hibridación para cada uno de los 29 polimorfismos de CYP2D6 (2 para CYP2C19) para proponer cuáles son los dos alelos e incluso cuál es el fenotipo metabolizador predicho para esa combinación de alelos. Debido a que el chip dispone de sondas específicas para los fragmentos específicos de duplicación y de delección, el sistema detecta sin problema la dosis de CYP2D6, así como cuál es el alelo duplicado en el caso de que lo hubiese. Así, finalmente el sistema emite un informe en el cual constan todos los polimorfismos y cómo es la muestra con respecto a cada uno: “*MUT*” (homocigoto para el alelo mutante), “*HET*” (heterocigoto mutante / salvaje), “*WT*” (homocigoto para el alelo *Wild Type o salvaje*) o “*NO CALL*” en el caso de que el sistema no haya sido capaz de designar ningún alelo para esa variable. Con estos genotipos el programa designa los dos alelos posibles mediante la nomenclatura estándar (según el **Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee**) y según la combinación de alelos propone una predicción sobre el estatus metabolizador de las enzimas CYP2D6 y CYP2C19. Según este sistema, para CYP2D6, el individuo con dos copias totalmente activas del gen es **Metabolizador Extensivo (EM)**, aquel con dos copias con actividad disminuida o una con actividad nula y otra normal será **Metabolizador Intermedio (IM)**, aquellos con dos copias con actividad nula o una con actividad disminuida y otra con actividad nula serán **Pobres Metabolizadores (PM)**, y aquellos con más de dos copias activas del gen serán **Metabolizadores Ultrarrápidos (UM)**. Para CYP2C19 se determinan

únicamente dos fenotipos predichos: Pobre Metabolizador y Metabolizador Extensivo. Además el informe incluye los datos relevantes tales como fecha, nombre de la muestra, etc.

#### 4. GENOTIPADO DE CYP1A2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN.

Para el genotipado por secuenciación de los alelos más relevantes de CYP1A2 se seleccionaron 4 fragmentos de tamaños que iban de los 430 a los 993 pares de bases. Estos fragmentos contienen los SNPs de interés, imprescindibles para el tipado de CYP1A2: -3860 g>a, -729 c>t, -163 c>a, -739 t>g, 248 c>t, 502 g>c, 558 c>a, 634 a>t, y 3534 g>a. Para la amplificación se utilizaron los *primers* indicados en la *Tabla 13* y las condiciones de PCR indicadas en las *Tablas 14 y 15*.

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
CYP1A2-1C-F	ACCGGTGACTCACACCTGTA	20
CYP1A2-1C-R	AACACAACGGGACTTCTTGG	20
CYP1A2-1K/1F-F	GAGGCCAGGAGAAGCTCTGT	20
CYP1A2-1K/1F-R	TGATAGGGGGCGGTGTTTAT	20
CYP1A2-11-F	CTGAGGTGTCCAGAGCCTTC	20
CYP1A2-11-R	GCCTGAAAAGTCCACCAGAG	20
CYP1A2-7-F	ATTATAGGCGCACCACCATGT	21
CYP1A2-7-R	CAAGGAAGAGGGAGGATGTTT	21
CYP1A2-1K/1F-SEC*	TCCATATACCCAAGGGACCA	20

*Tabla 14: Primers utilizados para la amplificación por PCR de los fragmentos necesarios para el tipado de CYP1A2 mediante secuenciación Directa. Los mismos primers fueron utilizados para las reacciones de secuenciación. \*CYP1A2-1K/1F-SEC se utilizó como primer interno en esta reacción con el fin de permitir la correcta secuenciación del fragmento CYP1A2 1K-1F.*

Nombre	TM	Tamaño Fragmento	SNPs Genotipados	Alelo
CYP1A2-1C-F	63,2°	430 pares de Bases	-3860 g>a	*1C
CYP1A2-1C-R	63,8°			
CYP1A2-1K/1F-F	64,9°	993 pares de Bases	-729 c>t, -163 c>a, -739 t>g	*1K y *1F
CYP1A2-1K/1F-R	65°			
CYP1A2-7'-F	63,2°	598 pares de Bases	3534 g>a	*7
CYP1A2-7'-R	65,1°			
CYP1A2-11-F	64°	845 pares de Bases	634 a>t, 558 c>a, 502 g>c, 248 c>t	*11
CYP1A2-11-R	63,7°			

Tabla 15: Características de los primers utilizados en la amplificación por PCR de los fragmentos de interés de CYP1A2.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX PCR		Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O (MQ)	12,75µl	94°	3 minutos	x35
Buffer 10x	2,5µl	94°	30 segundos	
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1,5µl	*	30 segundos	
dNTPs (5mM)	4µl	72°	30 segundos	
Primer-F	1µl	72°	7 minutos	
Primer-R	1µl			
TAq	0,75µl			
DNA:	2µl			

\* La temperatura de Annealing depende del fragmento como se indica en la Tabla 15

Tabla 16: Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de CYP1A2 mediante secuenciación directa

La reacción de secuenciación se realizó siguiendo un protocolo estándar de secuenciación bidireccional (igual al descrito en el epígrafe 1.5) mediante los primers descritos en la Tabla 15. Debido al tamaño del fragmento amplificado mediante los primers 1K/1F se utilizó un primer interno para la reacción de secuencia. La electroforesis de los productos secuenciados se realizó en un secuenciador de 96 capilares ABI 3730-XL DNA Analyzer.

## 5. GENOTIPADO DE CYP3A4 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA

Se realizó el genotipado de los polimorfismos -392 A-G, F189S y L293P mediante la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos que contuviesen dichos SNPs. Se diseñaron para ello tres parejas de *primers* (ver *Tabla 17*) de PCR con las cuales se realizó la amplificación en un termociclador Dyad de 96 pocillos, utilizando las condiciones descritas en la *Tabla 18*.

### PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)	Alelo
-392-F	CAGAAGGGATGACATGCAGA	20	*1B
-392-R	CACACACACCACTCACTGACC	21	
F189S-F	TGTGGCTGTTTGTCTGTCTTG	21	*17
F189S-R	TTGTGACAGGGGGCTGATAG	20	
L293P-F	ATGAAACCACCCCCAGTGTA	20	*18A
L293P-R	CCCTCCTTCTCCATGTACCA	20	

*Tabla 17: Primers diseñados para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de CYP3A4 por secuenciación directa*

### CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX PCR		Temperatura	Tiempo
H <sub>2</sub> O (MQ)	6,375µl	94°	3 minutos
Buffer 10x	1,25µl	94°	30 segundos
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	0,75µl	62°	30 segundos
dNTPs (5mM)	2µl	72°	30 segundos
Primer-F	0,5µl	72°	7 minutos
Primer-R	0,5µl		
TAq	0,125µl		
DNA:	1µl		

*Tabla 18: Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de CYP3A4*

La reacción de secuenciación se realizó siguiendo un protocolo estándar de secuenciación bidireccional (igual al descrito en el *epígrafe 1.3*) mediante los *primers* descritos en la *Tabla 17*. La electroforesis de los productos secuenciados se realizó en un secuenciador de 96 capilares ABI 3730-XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

## 6. GENOTIPADO DE CYP3A5 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA

Se realizó el genotipado de los polimorfismos 6986 A-G y 14690 G-A mediante la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos que contuviesen dichos SNPs. Se diseñaron para ello dos parejas de *primer* de PCR (*ver Tabla 19*) con las cuales se realizó la amplificación en un termociclador Dyad de 96 pocillos, utilizando las condiciones descritas en la *Tabla 20*.

### PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)	Alelo Genotipado
6986-F	ACTGCCCTTGCAGCATTTAG	20	*3
6986-R	CCAGGAAGCCAGACTTTGAT	20	
14690-F	TGGAAGGACGGTAAGAGGTG	21	*6
14690-R	TGTGTGAGGGCTCTAGATTGA	20	

*Tabla 19: Primers diseñados para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de CYP3A5 por secuenciación directa*

### CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX PCR		Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O (MQ)	6,375µl	94°	3 minutos	x35
Buffer 10x	1,25µl	94°	30 segundos	
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	0,75µl	62°	30 segundos	
dNTPs (5mM)	2µl	72°	30 segundos	
<i>Primer-F</i>	0,5µl	72°	7 minutos	
<i>Primer-R</i>	0,5µl			
TAq	0,125µl			
DNA:	1µl			

*Tabla 20: Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de CYP3A5*

La reacción de secuenciación se realizó siguiendo un protocolo estándar de secuenciación bidireccional (igual al descrito en el *epígrafe 1.3*) mediante los *primers* descritos en la *Tabla 19*. La electroforesis de los productos secuenciados se realizó en un secuenciador de 96 capilares ABI 3730-XL DNA Analyzer.

## 7. GENOTIPADO DE HTR2A, HTR2C y H2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA

Al igual que para el resto de genes, se diseñó una aproximación de baja capacidad mediante secuenciación directa, utilizando protocolos similares a los anteriormente citados: Amplificación por PCR de los fragmentos de interés, purificación de los productos obtenidos, reacción de secuenciación y secuenciación por electroforesis en ABI 3730-XL. Todas las reacciones de PCR y secuenciación fueron realizadas en termocicladores Dyad de 96 pocillos. La reacción de PCR se llevó a cabo mediante los *primers* enumerados en la *Tabla 21*, utilizando las condiciones descritas en las *Tablas 22 y 23*.

### PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
5HT2A 102-F	CAAGGTGAATGGTGAGCAGA	20
5HT2A 102-R	TAGGGACACTGCCATGATGA	20
5HT2A His452Tyr-F	AGGTCAGCCTTTTCACGGTA	20
5HT2A His452Tyr-R	AACCCCGCTTTTCATTGAC	19
5HT2C Cys23Ser-F	CCCGCGAGCATCTATAACAT	20
5HT2C Cys23Ser-R	CTGCCATGATCACAAGGATG	20
H2-1018-F	TACAGCCCGTGGCTAAGAAT	20
H2-1018-R	AAGGCCTGCATCTGTTTGT	20

*Tabla 21: Primers diseñados para la amplificación de los fragmentos de interés en el genotipado de HTR2A, HTR2C y H2 por secuenciación directa.*

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR *HTR2A* (5HT2A)

MIX PCR		Temperatura	Tiempo
H <sub>2</sub> O (MQ)	6,375µl	94°	3 minutos
Buffer 10x	1,25µl	94°	30 segundos
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	0,75µl	62° -60°* <sup>1</sup>	30 segundos
dNTPs (5mM)	2µl	72°	30-45 segundos* <sup>2</sup>
<i>Primer-F</i>	0,5µl	72°	7 minutos
<i>Primer-R</i>	0,5µl		
TAq	0,125µl		
DNA:	1µl		

\*<sup>1</sup>La PCR del SNP 102 utiliza una T<sup>a</sup> de *Annealing* de 60°, mientras que la del His452Tyr es de 62.

\*<sup>2</sup> La PCR del SNP 102 utiliza un tiempo de extensión de 30 segundos, mientras que el de His452Tyr es de 45 segundos.

Tabla 22: Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación por PCR de los dos fragmentos de interés del gen *HTR2A*

La reacción de secuenciación se realizó siguiendo un protocolo estándar de secuenciación bidireccional (igual al descrito en el epígrafe 1.3) mediante los *primers* descritos en la Tabla 21. La electroforesis de los productos secuenciados se realizó en un secuenciador de 96 capilares ABI 3730-XL DNA Analyzer.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR PARA *HTR2C* (5HT2C) y *H2*

MIX PCR		Temperatura	Tiempo
H <sub>2</sub> O (MQ)	6,375µl	94°	3 minutos
Buffer 10x	1,25µl	94°	30 segundos
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1,25µl	55°	30 segundos
dNTPs (5mM)	2µl	72°	45 segundos
<i>Primer-F</i>	0,5µl	72°	7 minutos
<i>Primer-R</i>	0,5µl		
TAq	0,125µl		
DNA:	1µl		

Tabla 23. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación por PCR de los dos fragmentos de interés los genes *HTR2C* y *H2*.

## 8. GENOTIPADO MEDIANTE SNaPshot®

### Fundamentos de la Técnica:

El protocolo para SNaPshot®™ (Applied Biosystems) consiste en varios pasos:

- 8.1 Desarrollo de los diseños de SNaPshot®
- 8.2 Amplificación de fragmentos elegidos por PCR *Multiplex*.
- 8.3 Reacción *Multiplex* de extensión de una sola base di-deoxi marcada, a partir de una sonda o *primer* de extensión no marcado (SNaPshot®).
- 8.4 Análisis de los fragmentos por electroforesis en ABI 3730-XL.

### 8.1 Desarrollo de los diseños de SNaPshot®

Dada la intención del diseño se optó por una estrategia de PCR *multiplex*, con el fin de poder tipar todas las variantes en una única reacción. Se diseñaron 14 pares de *primers* con el fin de amplificar 14 fragmentos que contuviesen los polimorfismos objeto de estudio. El diseño se realizó teniendo en cuenta las directrices para realizar la amplificación de los 14 amplicones mediante una única reacción de PCR: evitar la formación de dímeros, evitar la formación de estructuras secundarias en los propios *primers*, y optimizar las Temperaturas de *Melting*. Para ello se utilizó la herramienta de análisis Autodimmer, así como las herramientas de simulación de *melting* presentes en la página web de bioinformática <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications>. Se buscaron todos los *primers* posibles y se eligieron los que cumpliesen las condiciones óptimas. Se diseñaron 15 sondas

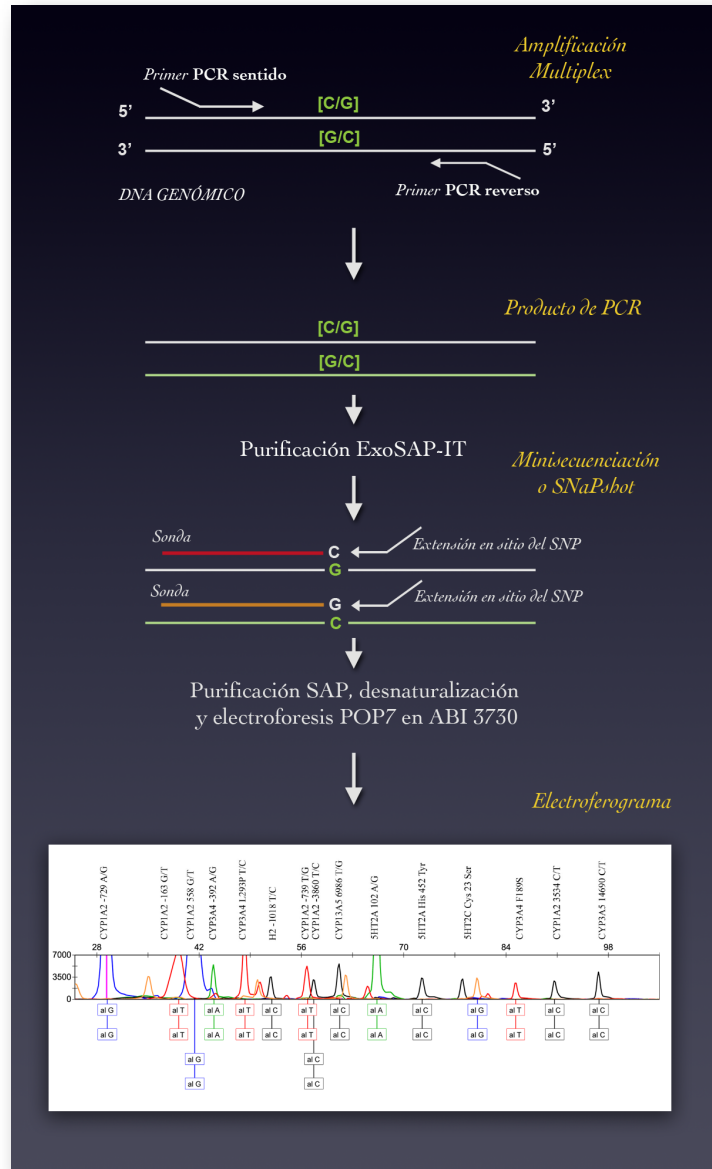


Figura 15: Flujo de trabajo del genotipado por SNaPshot®

(una para cada variable a tipar), siguiendo los criterios empleados para el diseño de *primers* para *multiplex*, pero teniendo en cuenta que esta vez la temperatura de *melting* debería ser lo más cercana a los 50°C que es la temperatura establecida por el Kit utilizado (ver *Tabla 25*). Con el fin de separar los productos en la electroforesis se ajustaron los tamaños de forma escalonada, desde las 21 bps de la sonda más corta a los 105 bps de la sonda más larga, mediante la adición de una cola polinucleotídica TAGC que no se une al DNA diana y evita la formación de estructuras secundarias pero confiere a las sondas una migración diferencial por tamaño. La naturaleza nucleotídica de esta cola minimiza su interferencia en la migración por la formación de estructuras secundarias y permite que los fragmentos migren sólo en función de su tamaño.

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR *MULTIPLEX*

Nombre	Secuencia	Tamaño del fragmento amplificado	TM
5HT2C Cys23Ser-F bis	GTTGTTTTGCATGAGCAACG	186 bp	60.30
5HT2C Cys23Ser-R bis	AATTTGAAGCGTCCACCATC	186 bp	59.94
CYP1A2 -163 c-a- F	CTACTCCAGCCCCAGAAGTG	200 bp	59.86
CYP1A2 -163 c-a- R	CTGATGCGTGTCTGTGCTT	200 bp	60.06
CYP1A2 3534 g-a- R	CATTGAGGTCCCTCCTTTCA	206 bp	60.04
CYP1A2 3534 g-a- F	TCTTCCCTCCTCAGCACAAAC	206 bp	60.39
CYP1A2 558 c-a- F	CCTCATCTCCTGCTACCTG	229 bp	59.82
CYP1A2 558 c-a- R	GAGGCAGTCTCCACGAACTC	229 bp	59.99
CYP1A2 -729 c-t- F	CTCAAGCACCTGCCTCTACA	299 bp	59.19
CYP1A2 -729 c-t- R	CCATCTCTCACAGTCTTGGA	299 bp	60.24
CYP1A2 -3860 -F	ACCGGTGACTCACACCTGTA	430bp	63,2°
CYP1A2 -3860 -R	AACACAACGGGACTTCTTGG	430bp	63,8°
CYP3A4 L293P t-c- F	ATGAAACCACCCCAGTGTA	336 bp	60.09
CYP3A4 L293P t-c- R	CCCTCCTTCTCCATGTACCA	336 bp	59.92
5HT2C Cys23Ser-F	CCCGCGAGCATCTATAACAT	363 bp	60.08
5HT2C Cys23Ser-R	CTGCCATGATCACAAGGATG	363 bp	60.07
5HT2A 102 T-C- F	CAAGGTGAATGGTGAGCAGA	378 bp	59.83
5HT2A 102 T-C- R	TAGGGGACTGCCATGATGA	378 bp	60.07
CYP3A5 14690 g-a- F	TGGAAGGACGGTAAGAGGTG	387 bp	55.00
CYP3A5 14690 g-a- R	TGTGTGAGGGCTCTAGATTGA	387 bp	47.62
CYP3A5 6986 a-g- F	ACTGCCCTTGCAGCATTTAG	393 bp	60.41
CYP3A5 6986 a-g- R	CCAGGAAGCCAGACTTGAT	393 bp	59.28
5HT2A His452Tyr- F	AGGTCAGCCTTTTCACGGTA	412 bp	59.73
5HT2A His452Tyr- R	AACCCCGCTTTTCATTGAC	412 bp	59.92
H2 -1018 g-a- F	TACAGCCCGTGGCTAAGAAT	454 bp	59.73
H2 -1018 g-a- R	AAGGCCTGCATCTGTTTGT	454 bp	59.74
CYP3A4 F189S t-c- F	TGTGGCTGTTTGTCTGTCTTG	477 bp	59.93
CYP3A4 F189S t-c- R	TTGTGACAGGGGGCTGATAG	477 bp	61.05
CYP3A4 -392 - F	CAGAAGGGATGACATGCAGA	594 bp	59.79
CYP3A4 -392 - R	CACACACACCACTCACTGACC	594 bp	60.10

Tabla 24: *Primers* utilizados para la PCR *Multiplex* para el genotipado por *SNaPshot*®.

## 8.2. Amplificación de fragmentos elegidos por PCR *Multiplex*.

La PCR *multiplex* se optimizó utilizando el *Qiagen Multiplex PCR Kit* partiendo de 1 microlitro de DNA. Se utilizaron placas específicas de 96 pocillos (*Microamp*<sup>TM</sup> *Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems) en las que cada poci-



## 8.4. Reacción de SNaPshot®<sup>™</sup>

La reacción de SNaPshot® consiste en una reacción *multiplex* de extensión de una sola base dideoxi marcada, a partir de una sonda o *primer* de extensión no marcado.

La reacción de SNaPshot® o minisequenciación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador Applied Biosystems 9700 partiendo de 3 µl de producto de PCR purificado y 1 µl de un *pool* equimolar de sondas. Para ello se utilizó el *SNaPshot® Multiplex Kit* de Applied Biosystems, que contiene los reactivos necesarios y los dideoxinucleótidos marcados. Cada reacción contuvo 5 µl de SNaPshot® reaction kit, 3 µl de DNA purificado 1 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ y 1 µl del *pool* de sondas.

Se utilizaron las condiciones especificadas: 25 ciclos de 96 C 10 segundos, 50°C 5 segundos y 60°C 30 segundos.

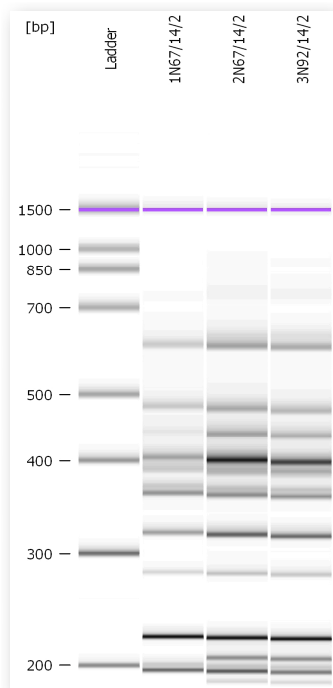


Figura 14: visión de gel del sistema Agilent 2100 correspondiente a la comprobación de las PCRs multiplex de tres muestras. En la calle 1 se muestra un marcador de peso molecular:

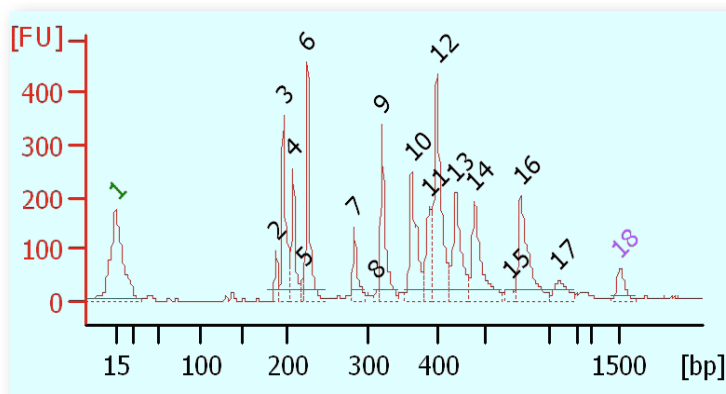


Figura 15: electroferograma de la PCR Multiplex empleada en el genotipado mediante SNaPshot®, en la que aparecen los picos correspondientes a los 15 fragmentos amplificados (los picos 1 y 18, señalados de color verde y azul corresponden al marcador utilizado por el sistema Agilent).

Los productos obtenidos fueron purificados añadiendo 1 UD de SAP e incubando 1 hora a 37° C, seguidos de una inactivación a 75° C durante 15 minutos (en un termociclador Applied Biosystems 9700) y preparados para la electroforesis en el ABI 3730-XL DNA Analyzer de 96 capilares añadiendo 9 µl de formamida Hi-Di<sup>™</sup> y 0,5 µl del marcador de peso molecular Genescan Liz120 (Applied Biosystems) a 0,5 µl del producto de SNaPshot®. Antes de cargar las muestras en el ana-

lizador las muestras fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 96° C y posteriormente enfriadas en hielo unos 4 minutos.

### 8.5. Análisis de las sondas extendidas por electroforesis:

Para el análisis de los fragmentos marcados se utilizó un protocolo de electroforesis para SNaPshot® en un ABI 3730-XL (Polímero POP7).

Para determinar los tamaños que cabría esperar para cada alelo de cada SNP se realizaron pruebas usando *SNaPshot® Primer Focus kit (Applied Biosystems)*, añadiendo cada base por separado a la sonda, comprobando así la migración según la base incorporada. ).

Los alelos fueron determinados automáticamente mediante la creación de un panel de análisis con el programa *Gene Mapper v0.37* de *Applied Biosystems* y comprobados de forma manual uno por uno. Asimismo los diferentes alelos obtenidos fueron verificados mediante secuenciación directa de los fragmentos amplificados en la fase de PCR *Multiplex*.

## 9. GENOTIPADO POR SEQUENOM®:

El genotipado mediante la plataforma Sequenom® fue llevado a cabo gracias a la ayuda del nodo de Santiago de Compostela del Centro Nacional de Genotipado (CeGen).

El sistema utilizado consistiría básicamente en los siguientes pasos:

- 9.1 Búsqueda de los SNPs o variantes polimórficas de interés.
- 9.2 Desarrollo y comprobación de los diseños para Sequenom®.
- 9.3 Preparación de las muestras.
- 9.4 Amplificación de fragmentos por PCR *Multiplex*.
- 9.5 Reacción de extensión de una sola base a partir de una sonda o *primer* de extensión.
- 9.6 Análisis de la sonda extendida mediante MALDI-TOF.
- 9.7 Interpretación de los resultados: programa de análisis.

### 9.1 Búsqueda de SNPs o variantes polimórficas de interés:

#### 9.1.1 CYP2D6

Las variantes haplotípicas o alelos de *CYP2D6* han sido definidas por el Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee y continuamente se actualizan con el hallazgo de nuevos polimorfismos.

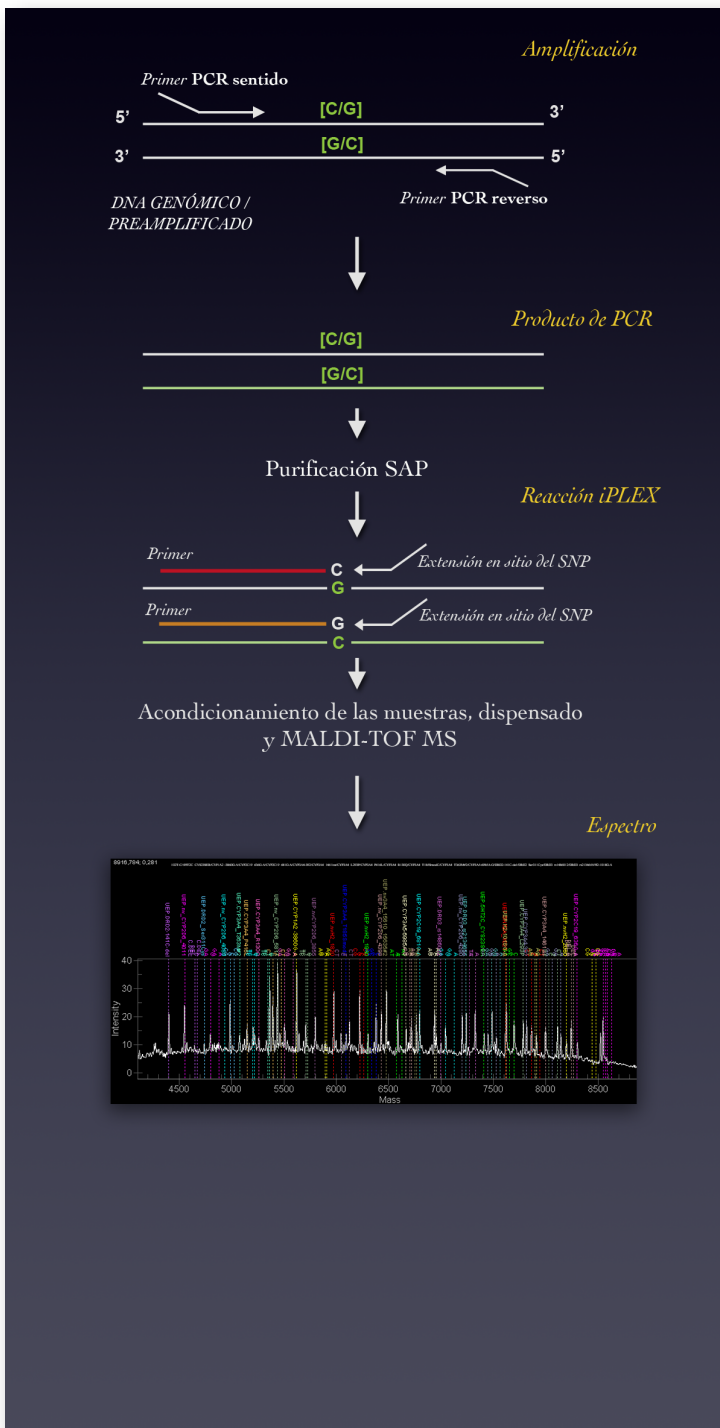


Figura 16: Flujo de trabajo del genotipado mediante Sequenom®

zuar la fiabilidad del genotipado (pese a que estos subtipos no son relevantemente diferentes del alelo del que provienen).

Estudios previos contrastados indican que ciertas variantes alélicas provocan un cambio en la actividad enzimática de forma que esta puede ser disminuida (menor de lo habitual), normal o incrementada (mayor de lo normal). En el caso de *CYP2D6* deberíamos hablar, más que de alelos, de haplotipos, ya que la mayor parte vienen definidos más por una combinación de genotipos en distintas posiciones que por una única variante polimórfica. Para un estudio correcto habrá de escogerse con cautela el número mínimo de posiciones que permitan diferenciar los alelos de interés de forma unívoca teniendo en cuenta todas las posibilidades de combinaciones entre dos cualesquiera de los mismos. Para ello se llevó a cabo una tabla matriz con las variantes que definían los alelos de interés (ver *Tabla 26A en Anexo 3*). Muchas de ellas ya había sido genotipadas por secuenciación en la etapa anterior del estudio (ver *Tabla 1*), sin embargo muchos de los alelos no podrían haber sido genotipados mediante la secuenciación de las variantes anteriormente utilizadas. Así finalmente se eligieron los 25 alelos más relevantes, en alguno de los cuales fue necesaria la inclusión de subtipos para garantizar

Los polimorfismos elegidos fueron: -1584C>G, 31G>A, 100C>T, 124G>A, 138insT, 883G>C, 1023C>T, 1039C>T, 1659G>A, 1661G>C, 1707T>del, 1758G>T, 1758G>A, 1863RepeatInsTTTCGCCCC, 1846G>A, 1973\_1974insG, 2539-2542deIAACT, 2549A>del, 2613-2615delAGA, 2850C>T, 2935A>C, 3183G>A, 3198C>G, 3277T>C, 4042G>A, 4180G>C. Todas estas posiciones hacen referencia a la secuencia M33388 del GeneBank. Excepto el cambio -1584C>G que está situado en la zona del promotor, todos son polimorfismos exónicos.

El genotipado de estos SNPs nos permite la determinación de los alelos \*1 (salvaje), \*2A, \*2B, \*2D, \*3, \*4A, \*4B, \*4D, \*4J, \*4K, \*6, \*6C, \*7, \*8, \*9, \*10A, \*10B, \*11, \*12, \*14A, \*14B, \*15, \*17, \*19, \*20, \*25, \*26, \*29, \*30, \*31, \*35, \*40, \*41 (*Ver Tabla 26A en Anexo 5*). Algunos de estos polimorfismos son unívocos, es decir, su aparición implica directamente la presencia de un alelo determinado. Esto ocurre con los alelos \*3, \*4, \*7, \*9, \*11, \*12, \*15, \*19, \*20, \*25, \*26, \*29 y \*35. Lamentablemente existen otros alelos cuya determinación implica el análisis de, sino todos, prácticamente todos los polimorfismos del estudio.

### 9.1.2 Otros genes:

Dada la relevancia de otros genes en el metabolismo y acción de los fármacos antipsicóticos y la gran capacidad de la plataforma en cuanto al número de variables tipadas, parecía interesante incluir los polimorfismos estudiados anteriormente mediante la técnica del SNaPshot®, con el fin de desarrollar un panel completo de genes implicados en la farmacogenética de los antipsicóticos. Además se introdujeron algunas variantes nuevas de estos mismos genes.

Los polimorfismos de otros genes fueron: 5HT2A\_102T-C, 5HT2A\_HIS452TYR, 5HT2C\_CYS23SER, CYP1A2 -3860G-A, CYP1A2 -739T-G, CYP1A2\_3534G-A, CYP1A2\_558C-A, CYP1A2\_634A-T, CYP1A2-163C-A, CYP2C19\_636G-A, CYP2C19\_681G-A, CYP3A4\_1461ins, CYP3A4\_L293P, CYP3A4\_P416L, CYP3A4\_R130Q, CYP3A4\_T185S, CYP3A4\_T363M, CYP3A4-392, CYP3A5\_14690G-A, CYP3A5-6985A-G (*ver Tabla 26B en Anexo 4*).

## 9.2 Desarrollo y comprobación de los diseños para Sequenom®.

### 9.2.1 Aproximaciones para la detección de dosis de CYP2D6.

Posición	Nucleótido
nv_CYP2D6_4011	CYP2D6: G CYP2D7: A
nv_CYP2D6_4089	CYP2D6: T CYP2D7: C
nv_CYP2D6_4280	CYP2D6: G CYP2D7: A
nv_CYP2D6_4398	CYP2D6: G CYP2D7: A
nv_CYP2D6_5472	CYP2D6: G CYP2D7: A
nvCYP2D6_3855	CYP2D6: T CYP2D7: C
nv_CYP2D6_5811	CYP2D6: T CYP2D7: C
nv3A4_15610_15635#1	No Polimórfico: G
nv3A4_15610_15635#2	No Polimórfico: G
nvH2_1820	No Polimórfico: C
nvH2_1940	No Polimórfico: T

Tabla 27: Posiciones no polimórficas tipadas para la detección de dosis del gen CYP2D6 mediante Sequenom®.

A la hora de desarrollar un chip de genotipado mediante Sequenom® hubo que tener en cuenta que debían solucionarse dos cuestiones metodológicas: por un lado el genotipado de los genes anteriormente analizados por SNaPshot®, para lo cual podría partirse de DNA genómico, puesto que no necesita ningún tipo de modificación, y el genotipado de CYP2D6. Para este último debería utilizarse DNA preamplificado de cada una de las muestras a tipar, ya que de lo contrario el pseudogén CYP2D7 interferiría con los resultados. Por otro lado la detección de dosis fue realizada mediante tres aproximaciones:

**a) Comparación de las áreas de los picos en SNPs de CYP2D6 en heterocigosis.**

Esto se realizó a partir del DNA preamplificado del gen CYP2D6, utilizando los mismos SNPs que definen los alelos de este gen (ver Tabla 26A en Anexo 3).

**b) Comparación de las áreas de los picos de nucleótidos no polimórficos que difieren entre CYP2D6 y CYP2D7 (nucleótidos “nv\_CYP2D6”. Ver Tabla 27).**

Para esta comparación se utilizó DNA genómico sin preamplificar.

**c) Comparación de áreas de picos de posiciones no polimórficas de *CYP2D6* y posiciones no polimórficas de otros genes (“nv” de *CYP2D6* y “nv” de otros genes. Ver *Tabla 27*)**

Para este estudio también se partió de DNA genómico.

Así pues, se utilizaron de dos tipos de muestra: **DNA genómico** que se utilizó para tipar las variables de los genes distintos a *CYP2D6* y las posiciones no polimórficas de *CYP2D6* / *CYP2D7* y **DNA preamplificado** a partir del cuál se realizará el genotipado alélico de *CYP2D6* y de SNPs de alta heterozigidad.

**9.2.2 Ensayos (reacciones de PCR multiplex realizadas en un mismo pocillo):**

(Ver *Tablas Anexo 1 y 2*)

**1. Ensayos con DNA Amplificado:** Se diseñaron 4 ensayos (“*Plexes*”)

- W1: 14 polimorfismos

CYP2D6\_1023\_1039#1, CYP2D6\_124\_138#1, CYP2D6\_124\_138#2, CYP2D6\_1659\_1661#1, CYP2D6\_1869, CYP2D6\_2097, CYP2D6\_2466, CYP2D6\_2613-2615, CYP2D6\_2850, CYP2D6\_2935, CYP2D6\_31, CYP2D6\_4042, CYP2D6\_845\_883#2, CYP2D6-1584.

- W2: 8 polimorfismos

CYP2D6\_1659\_1661#2, CYP2D6\_1707, CYP2D6\_1973, CYP2D6\_2539-2542\_2549#1, CYP2D6\_3183\_3198#1, CYP2D6\_3183\_3198#2, CYP2D6\_4180, CYP2D6\_845\_883#1.

- W3: 4 polimorfismos

CYP2D6\_100, CYP2D6\_1023\_1039modT, CYP2D6\_1758, CYP2D6\_1846

- 4 replex: 2 polimorfismos

CYP2D6\_1023\_1039modC, CYP2D6\_138COR

**2. Ensayos con DNA Genómico**

- W1: 28 polimorfismos

5HT2A\_102T-C, 5HT2C\_CYS23SER, CYP1A2 -3860G-A, CYP2C19\_636G-A, CYP2C19\_681G-A, CYP3A4\_1461ins, CYP3A4\_L293P, CYP3A4\_P416L, CYP3A4\_R130Q, CYP3A4\_T185SmodC, CYP3A4\_T363M#2, CYP3A4-392, CYP3A5-6985A-G, DRD2\_Ser311Cys, DRD2-141C-del, DRD3\_rs1486012, DRD3\_rs2134655, H2-1018G-A, nv\_CYP2D6\_4011, nv\_CYP2D6\_4089,

nv\_CYP2D6\_4280, nv\_CYP2D6\_4398, nv\_CYP2D6\_5811, nv3A4\_15610\_15635#2, nvCYP2D6\_3855, nvH2\_1820, nvH2\_1940, nvH2\_2060.

- W2: 14 polimorfismos

CYP1A2-163C-A, DRD3\_RS6280, CYP1A2 -739T-G, CYP1A2\_558C-A, CYP1A2\_3534G-A, CYP3A5\_14690G-A, MDR1\_C3435T, DRD3\_rs7631540, CYP1A2\_634A-T, nv\_CYP2D6\_5472, MDR1\_G2677A-T, CYP3A4\_T363M#1, DRD3\_rs963468, CYP3A4\_T185SmodT.

- W3: 3 polimorfismos

nv3A4\_15610\_15635#1, CYP3A4\_T185S#2, 5HT2A\_HIS452TYR

Nota: algunos de estos polimorfismos no han sido utilizados como parte de este estudio, pese a que poseen cierto interés farmacogenético, y se han incluido con vistas a un futuro incremento del panel de SNPs. Son así los polimorfismos de los genes *DRD2*, *DRD3* y *MDR1* (Ver Tabla 26 B en Anexo 4).

### 9.3 Preparación de las muestras:

Se partió de DNA extraído a partir de sangre total mediante distintos métodos. A todas las muestras se les realizó una cuantificación mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop® ND-1000, asegurando una cantidad mínima de 10-20 ng/μl, teniendo en cuenta que es necesario un volumen mínimo de 2μl por reacción para su uso en Sequenom® (debido a requerimientos de la robótica y la química de la tecnología iPlex) y, al menos 6μl para la preamplificación del gen completo.

#### 9.3.1 PREAMPLIFICACIÓN DE CYP2D6

A todas las muestras y controles se le realizó una amplificación por PCR del fragmento de 6237 bps. conteniendo el gen completo *CYP2D6* y un fragmento del promotor. Se trata de una PCR larga con un protocolo idéntico al utilizado en el genotipado por secuenciación, utilizando Taq Expand Long Template PCR System (Roche) y un termociclador de placas DYAD (DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler de Bio-Rad). Se utilizó 1 μl de DNA, pero tras chequear las PCRs en Agilent se comprobó que los resultados mejoraban utilizando una dilución 1:5 / 1:10 del DNA de partida.

PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6

Nombre	Secuencia	Tamaño (pares de bases)
C2D6-F*1	GCTGCCATACAATCCACCTG	21
C2D6-R*2	GCCTCAACGTACCCCTGTCTC	21

CYP2D6-F\*1: Primer diseñado para el estudio, CYP2D6-R\*2: Primer diseñado por Müller et al.

Tabla 28: Primers de PCR diseñados para la amplificación del gen CYP2D6 completo.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR

MIX 1		MIX 2		Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O (MQ)	6µl	H <sub>2</sub> O (MQ)	9,625µl	93°	2 minutos	
dNTPs (5mM)	3,5µl	Buffer	2,5µl	93°	10 segundos	x10
CYP2D6-F	1µl	TAq Expand	0,375µl	62°	30 segundos	
CYP2D6-R	1µl			68°	4 minutos	
				93°	15 segundos	x20
				62°	30 segundos	
TOTAL	11,5µl	TOTAL	12,5µl	68°	4 minutos*	
				68°	7 minutos	

DNA: 2µl

\* (+20 segundos por ciclo)

Tabla 29: Condiciones de PCR para la pre-amplificación por PCR del Gen completo CYP2D6.

La comprobación de las amplificaciones fue realizada mediante el sistema de electroforesis en agarosa Ready-To-Run de 96 pocillos (Amersham), lo cuál permite analizar un número elevado de muestras en muy poco tiempo. Además, con el fin de asegurarnos que el fragmento detectado mediante este sistema correspondía al fragmento de interés se realizó un segundo chequeo de 10 productos elegidos al azar, mediante el sistema de electroforesis Agilent, mucho más preciso y que permite identificar correctamente el tamaño de las bandas obtenidas.

Con el fin de asegurarnos que el fragmento amplificado correspondía únicamente a CYP2D6 y no a CYP2D7 (lo cuál interferiría en los genotipados) se secuenció un fragmento mediante los primers C2-F y C2-R utilizados anteriormente en el genotipado de CYP2D6 por secuenciación. Este fragmento contiene posiciones no homologas entre CYP2D6 y CYP2D7; genotipando estas posiciones por secuencia comprobamos que no aparecen como heterocigotos, lo cuál indicaría una amplificación conjunta de los dos genes, ni homocigotos para el nucleótido correspondiente a CYP2D7, lo que implicaría que CYP2D6 no habría sido amplificado.

### 9.3.2 PREPARACIÓN DE PLACAS:

Sequenom® gestiona placas de 384 pocillos, que sólo pueden ser manipuladas mediante robots. Cada placa de Sequenom® corresponde a 4 placas de PCR de 96 pocillos. Las muestras proporcionadas al CeGen deben estar normalizadas y dispuestas en placas de 96 pocillos: deberán ajustarse las concentraciones para igualarlas y conseguir un volumen mínimo de 40-60 µl.

### 9.4 Amplificación de Fragmentos por PCR Multiplex:

Las muestras son transferidas mediante robots de las placas de 96 pocillos a placas de 384 pocillos. El dispensado de la mix de PCR también se realiza mediante el robot, en una sala de pre-PCR, utilizando plantillas de forma que se puede definir en qué pocillos se dispensan qué *primers*. De esta forma podemos realizar varios ensayos en cada placa, dependiendo del número de muestras. La mix de PCR contiene los *primers* de amplificación (*Ver Tabla 30 en Anexo 1*) diseñados en la etapa de diseño, junto a los deoxinucleótidos trifosfato, la DNA polimerasa y un tampón determinado.

La amplificación se realizó en termocicladores Geneamp® PCR System 9700 de Applied Biosystems con capacidad para dos placas de 384 pocillos.

Tras la reacción de PCR es necesario realizar una purificación por SAP, según el protocolo habitual de Sequenom® para iPlex: se añade, a cada 5 µl de producto de PCR, 2µl de Mix SAP compuesta de 1,530 µl de H<sub>2</sub>O, 0,17 µl de buffer 10x y 0,3µl de enzima SAP a 1U/µl. Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se neutraliza la actividad de la enzima con un ciclo de 85°C durante 5 minutos.

### 9.5 Reacción de extensión de una sola base a partir de la sonda (iPlex):

Las sondas diseñadas en la etapa de diseño mediante programa (*Ver Tabla 31 en Anexo 2*) serán las encargadas de unirse a los fragmentos amplificados en la región flanqueante al polimorfismo y extender una base complementaria al nucleótido a tipar de una forma similar a la reacción de secuenciación común. Estas sondas, así como los reactivos necesarios para la extensión responden a una química específica conocida como iPlex, que permite realizar simultáneamente un mayor número de reacciones o plexes superior a 36. El proceso de dispensado de sondas y reactivos es llevado a cabo mediante robótica en una sala separada de la utilizada para la preparación de la PCR (post-PCR) para evitar contaminación.

La reacción de extensión también se realizó mediante termocicladores Geneamp® PCR System 9700 de Applied Biosystems (dos placas de 384 pocillos).

## 9.6 Análisis de la sonda extendida mediante MALDI-TOF-MS

La plataforma Sequenom® utiliza una tecnología basada en ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) asociada a un espectrógrafo de masas basado en el tiempo de vuelo de los iones (TOF-MS). Esta técnica se conoce como MALDI-TOF MS.

**MALDI (*Matrix Assisted Desorption/ionization*):** Se basa en la cocrystalización sobre un portaobjetos de los analitos (en este caso, fragmentos de ADN) con una matriz (generalmente un compuesto aromático). Posteriormente le será aplicado un haz láser (N<sub>2</sub> pulsado a 337nm), lo cual provoca la ionización del analito. Esta reacción está facilitada por la presencia de la matriz que absorbe la energía del haz, transfiriéndosela al analito, lo cual proporciona una carga eléctrica al analito, que se desorbe e ioniza. **TOF MS (*Time-of-flight Mass Spectrometry*),** Los analitos ionizados obtenidos en el proceso de MALDI son acelerados en un campo eléctrico y los envía hasta una zona libre de campos eléctricos lo cual iguala la energía cinética de los iones. Al igualar las energías cinéticas, la velocidad en esta zona dependerá de la carga y la masa de los iones (relación masa-carga), de forma que aquellos iones más ligeros adquirirán una mayor velocidad en la zona libre de carga. Finalmente los analitos ionizados llegan a un detector, con lo cual se determina el tiempo de vuelo de las moléculas ("Time of Flight"), del cual se puede inferir la relación masa-carga de las mismas. Mediante esta técnica podemos separar por sus masas-cargas dos fragmentos idénticos de DNA que difieran en una sola base, ya que los distintos nucleótidos poseen una carga y un peso ligeramente distintos entre si. Jugando con las variaciones de masa-carga que posee un fragmento podremos determinar, por ejemplo, la naturaleza de un nucleótido extendido en una reacción de minisequencia. Esto unido a la posibilidad de marcar las sondas de extensión de este tipo de reacciones con distintos fluorocromos nos posibilita el análisis conjunto de un gran número de polimorfismos en una única reacción. Se utilizó el programa Typer Analyzer para comprobar los genotipos obtenidos de cada SNP y la calidad de los picos.

### 9.7 Interpretación de los resultados: programa de análisis.

Para el análisis de los datos, especialmente los derivados del genotipado de CYP2D6 (elaboración de los alelos y determinación de la dosis alélica) se desarrolló un programa de análisis, debido a la gran cantidad de información a procesar. Este programa determina todas las posibilidades combinatorias de los haplotipos posibles con los SNPs genotipados a partir de los datos obtenidos mediante el programa de análisis de Sequenom® (Typer Analyzer) y emite como resultado un genotipo completo en forma de dos alelos. Asimismo determina la dosis génica a partir del análisis de SNPs mediante los métodos anteriormente descritos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El programa de farmacogenética aquí expuesto surgió de la necesidad de dar soporte tecnológico y de conocimiento a un estudio centrado en la farmacogenética de antipsicóticos en pacientes con esquizofrenia del área sanitaria de Ourense. Al comenzar dicho estudio se vio como una necesidad a la vez que una oportunidad el asegurar tanto una plataforma técnica como un bagaje de conocimiento que permitiera su utilización no sólo en el estudio concreto sino en su posible aplicación práctica en el futuro clínico. Esto implicaba desarrollar un completo programa de farmacogenética, para lo cual tanto las muestras y la casuística del estudio de Ourense como los múltiples problemas que hubo que solventar, supusieron una ayuda valiosa.

Los protocolos farmacogenéticos fueron desarrollados de forma paralela a este estudio, que sirvió para iniciar el desarrollo y poner a punto un método óptimo de genotipado, elaborar una serie de predicciones a nivel de respuesta a diferentes antipsicóticos según el genotipo del paciente. Estos protocolos fueron aplicados en dicho estudio, y finalmente implementados a la práctica en otro estudio en el cual se genotiparon 363 muestras procedentes de Brasil.

A la hora de plantear un test farmacogenético surge la duda de a qué entidad deberá aplicarse: ¿Debe realizarse un test específico para un medicamento específico?, ¿es mejor desarrollar tests individuales para cada uno de los genes relevantes en farmacogenética y que el demandante solicite cuál o cuáles desea realizar independientemente de para qué entidad farmacológica se solicite?, o ¿es quizá más acertado realizar un único test para una entidad patológica tratada con un grupo de medicamentos concreto, aunque ello signifique ofrecer información sobre fármacos que quizá nunca lleguen a ser administrados al paciente?. Aunque todos estos enfoques pueden ser perfectamente válidos, decidimos decantarnos por esta última aproximación, fundamentalmente debido a la naturaleza de la esquizofrenia como enfermedad y a la naturaleza de los tratamientos antipsicóticos como tratamiento de dicha enfermedad. Es muy posible que un mismo paciente, a lo largo de toda su vida, sea tratado con distintos fármacos, con lo cual la información adicional que podamos darle a un paciente sobre medicamentos con los que no va a ser inicial-

mente tratado es información valiosa. El estudio CATIE, publicado en 2005 indica que un 74% de los pacientes tratados con antipsicóticos abandonan por distintas causas el tratamiento pasado un periodo medio de tiempo de aproximadamente un año y medio (Lieberman et al., 2005). Aunque uno de los principales objetivos de la farmacogenética sería intentar disminuir este porcentaje, el hecho de ofrecer una información “de por vida” que pueda ayudar al facultativo a lo largo del discurrir de la enfermedad de su paciente es un objetivo igualmente valioso.

La idea de plantear un sistema compacto de información farmacogenética que abarcase el mayor número de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la psicosis, conllevó a que desde el inicio se plantease como objetivo final la adopción de una plataforma, única a poder ser, de genotipado que abarcase todos los genes implicados en la respuesta a los distintos antipsicóticos.

## 1. DESARROLLO Y ELECCIÓN DE UN MÉTODO DE GENOTIPADO ÚTIL PARA SU USO EN FARMACOGENÉTICA.

En la búsqueda de un método de genotipado idóneo para aplicar la farmacogenética a la práctica clínica se deben enfatizar los siguientes puntos: rapidez, seguridad, robustez de la técnica y coste-efectividad. La búsqueda de un método de genotipado óptimo partió de la existencia del *proyecto piloto de Farmacogenética en antipsicóticos del área sanitaria de Ourense*. Según se fue planteando dicho estudio, las necesidades que debía cumplir la técnica variaron, pero siempre con vistas a la obtención de un solo método de alta capacidad y que cumpliese los requisitos antes citados, un método que permitiese la integración de la farmacogenética en el día a día clínico. El planteamiento del estudio en sí mismo sirvió para elegir los marcadores y desarrollar los distintos métodos de tipado, ponerlos a punto y elegir el idóneo, pero también como validación de los mismos.

Desde una perspectiva poco ambiciosa, más bien exploratoria, el estudio se inició con el análisis de unas pocas de las numerosas variantes del gen CYP2D6, ignorando los problemas derivados de la existencia del pseudogén CYP2D7 e intentando minimizar los derivados de la estructura haplotípica de los alelos, que no vienen definidos por un solo SNP sino por una combinación de cambios con respecto al alelo salvaje. Para esta aproximación preliminar la técnica idónea parecía la **secuenciación directa** de fragmentos del gen que contuviesen aquellas posiciones variables necesarias para detectar esos pocos alelos interesantes, fundamentalmente aquellos que implican un metabolismo reducido (o incluso nulo). Esta técni-

ca resulta notablemente más rápida y sensible que las utilizadas en esta época, fundamentalmente análisis de fragmentos de restricción (RFLPs). Posteriormente se optimizó la técnica mediante una **PCR previa** del CYP2D6 completo con el fin de eliminar la influencia del pseudogén en los resultados. La detección de las duplicaciones y deleciones, fenotípicamente relevantes, era entonces una tarea complicada debido a que requiere la puesta a punto de una técnica adicional complementaria al genotipado por secuenciación. Siguiendo experimentos similares se puso en marcha una **amplificación específica de duplicación** y otra **específica de deleción**, (*ver Materiales y Métodos, epígrafe 2*) mediante la cual se puede detectar la presencia de alelos duplicados y delecionados, aceptando el hecho de ignorar cuál de los dos alelos es el duplicado como un mal menor.

Posteriormente, ante las dificultades relacionadas con la dosis y previendo la necesidad de incrementar el número de SNPs para mejorar la capacidad de genotipado y el número de alelos, algunos de los cuales se habían descartado pese a que la frecuencia esperada en población caucasoide era relevante, se decidió que era necesario adoptar otro sistema de genotipado, de mayor capacidad. Se realizó un cuadro de SNPs que incluyese todos los necesarios para asegurar un genotipado fiable de cada uno de los alelos relevantes, con la idea de utilizar la plataforma de Sequenom®, con una alta capacidad de genotipado tanto por el número de SNPs como por el número de muestras. Este hecho coincidió, sin embargo, con la aparición de una nueva técnica de genotipado enfocada precisamente al análisis del CYP2D6: el **Amplichip P450** de Roche, una técnica basada en hibridación específica y que permitía, además del genotipado alélico, identificar aquellos alelos duplicados e incluso la deleción del gen completo, uno de los problemas con lo que nos habíamos encontrado. Mientras se realizaba el tipado de CYP2D6 mediante este método, se planteó la necesidad, debido a la amplia variedad de tratamientos en la muestra del estudio, de incrementar el número de genes a estudiar, ya que CYP2D6 únicamente metaboliza Risperidona y Aripiprazol. Así se planteó inicialmente el estudio de CYP1A2, que metaboliza Olanzapina y Clozapina. Este análisis se realizó mediante secuenciación directa. Posteriormente se decidió ampliar aún más la batería de genes a analizar, con el fin de incluir otros antipsicóticos como la Quetiapina o la Ziprasidona e incrementar la fiabilidad del método, y la técnica utilizada fue **SNaPshot®**. Esta técnica basada en la minisequenciación permite el análisis simultáneo de varios SNPs en una única reacción. Así incluimos H2, 5HT2A, 5HT2C, CYP3A4, y CYP3A5. A este grupo de genes se les añadieron las variables previamente estudiadas de CYP1A2: con esto se pretendía desarrollar una técnica rápida y compacta complementaria al genotipado de CYP2D6, aplicable a la rutina farmacogenética, y no sólo útil para el estudio. Finalmente se optó por optimizar un sistema de genotipado único para todas las variables de todos los genes, que permitiese la introducción del análisis farmacogenético en pacientes tra-

tados con antipsicóticos como una prueba clínica más. El método debería ser eficiente, altamente coste-efectivo, y permitir un volumen de muestras elevado así como un elevado número de variables. Para ello se eligió la plataforma de Sequenom®, perteneciente al CeGen, y basada en la tecnología iPLEX para MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Esta técnica nos permite el análisis de un cientos de variables en un número muy elevado de pacientes en un tiempo mínimo. (Ver *Materiales y Métodos, epígrafe 9*)

De entre las técnicas utilizadas podemos diferenciar dos estilos de técnicas dependiendo de la capacidad de genotipación: Métodos de Baja capacidad, útiles para un bajo número de muestras o un bajo número de variables a genotipar, y Métodos de Alta capacidad, idóneos para un número elevado de muestras y un elevado número de variables.

## 1.1 MÉTODOS DE BAJA CAPACIDAD:

### 1.1.1 SECUENCIACIÓN DE CYP2D6

La medición del estatus metabolizador de CYP2D6 mediante el test de la debrisoquina (Lennard et al., 1977), basado en el medida del ratio debrisoquina / 4-hidroxidebrisoquina en la orina fue durante muchos años la técnica de referencia absoluta a la hora de establecer las variaciones interindividuales presentes en este gen. A esta técnica le siguieron otras que sustituían el fenotipado tradicional por un genotipado basado en PCR-RFLP (Sachse et al. 1997). Este método, aunque permite la detección de las duplicaciones y deleciones características del gen, implica un consumo importante de tiempo, tiene una baja sensibilidad y especificidad y resulta poco efectivo para su aplicación rutinaria. Además no se trata de una técnica fácilmente escalable, pues no facilita la incorporación de nuevos marcadores en el caso de que fueran necesarios. Así pues debíamos plantearnos otro método más fiable, rápido, y con posibilidad de incrementar el número de marcadores.

El primer método de elección, debido a las necesidades (se había planteado un estudio de asociación entre el fenotipo metabolizador predictivo de CYP2D6 definido por su genotipo y el estatus clínico de respondedor / no respondedor de pacientes esquizofrénicos), debía ser un método medianamente rápido, fiable, versátil, barato y fácil de poner en marcha. El método elegido para esta fase del estudio fue la Secuenciación del gen CYP2D6 en secuenciador automático ABI 3730-XL (Applied Biosystems):

Mediante la secuenciación directa de 6 fragmentos y el análisis de 12 posiciones polimórficas se definieron 12 de los alelos más relevantes: el alelo \*2, \*3, \*4, \*6, \*7, \*8, \*9, \*10, \*11, \*12, \*14 y \*15. El alelo salvaje, \*1, se definió por exclusión lo cuál implicaba que los datos obtenidos al respecto debían ser tomados con precaución, ya que se obviaba la existencia de otros SNPs no tipados que también pudiesen definir alelos. Debido a que los alelos de CYP2D6 se definen como haplotipos y la mayoría no están determinados por la aparición de un único SNP esta aproximación resultaba incompleta (ver *Tabla 1*).

Inicialmente se obvió también la existencia del pseudogén CYP2D7 que presenta una enorme homología con CYP2D6 (en torno al 98%). Ello implicaba la posibilidad de estar tipando conjuntamente ambos genes, lo cual enturbiaba los resultados. Curiosamente, y por azar, el diseño inicial basado únicamente en cuatro *primer* de PCR, salvaba por azar este escollo ya que se situaban en regiones no homólogas, pero una posterior revisión de los haplotipos indicó la necesidad de ampliar a 12 los SNPs a tipar, precisándose un mayor número de fragmentos y los *primer* para estos nuevos fragmentos se situaban en regiones totalmente homólogas de CYP2D6 y CYP2D7. En este momento surge la necesidad de asegurar que los genotipos obtenidos corresponden a CYP2D6 y no a su pseudogén. Para ello se optimizó la PCR del gen completo basada en el protocolo de Müller y colaboradores, como paso previo a la amplificación de los fragmentos a secuenciar (Müller et al. 2003).

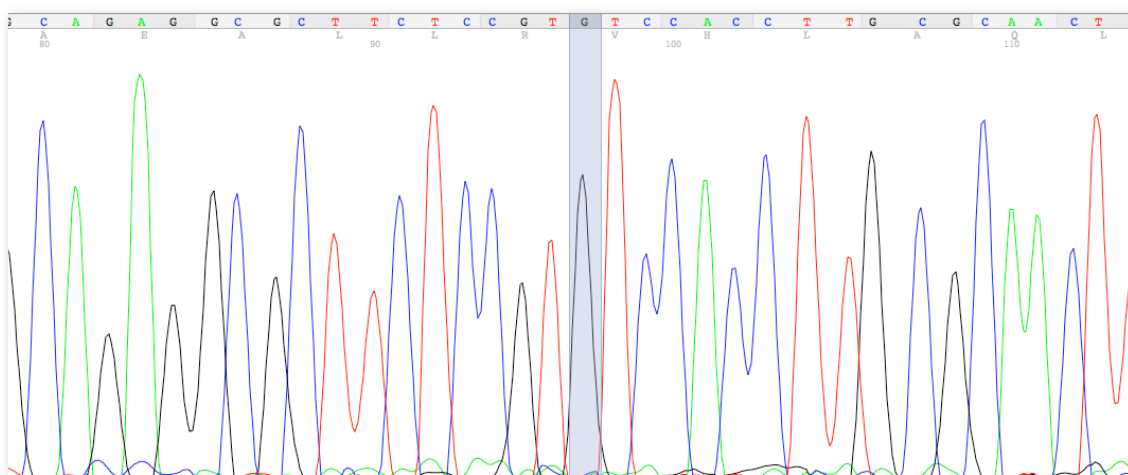


Figura 17: Electroferograma correspondiente a la secuencia del polimorfismo de CYP2D6 1661 G>C (resaltada en azul la posición: la muestra es homocigota G/G)

## PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

Es evidente que la secuenciación resulta, para un laboratorio acondicionado, una de las técnicas más sencillas y suele ser la primera técnica de elección en la mayoría de los estudios, incluso como paso previo al desarrollo de otros métodos más avanzados. La implementación de la secuenciación frente al genotipado por PCR-RFLPs permite realizar el análisis de las variaciones polimórficas de una forma más rápida, bastante menos engorrosa y mucho más fiable. Permite además la detección de nuevas variaciones no descritas del DNA que pudiesen ocurrir, aunque este no sea el caso ya que las posiciones a estudiar ya se han definido claramente. Es fácilmente “*estandarizable*” y permite la adición de nuevos marcadores, lo cual resulta sumamente importante si tenemos en cuenta que la cantidad de alelos de *CYP2D6* (según la *CYP Allele Nomenclature*) se incrementa cada año (actualmente hay 63 alelos definidos, y numerosos subtipos).

Pese a que la secuenciación pasa por ser una de las técnicas más extendidas y fiables, no es ni mucho menos una técnica rápida para ser aplicada bien de forma rutinaria, bien de forma masiva, en el análisis de haplotipos de muchos SNPs situados en distintas zonas del gen. Si bien muchos de los SNPs se encuentran muy cercanos unos de otros (lo cual puede dificultar el uso de otro tipo de técnicas), facilitando el análisis por secuenciación, la lectura de secuencias puede resultar lenta cuando se trata de un número elevado de posiciones y más aún cuando uno de los objetivos es aplicar el análisis farmacogenético a la práctica asistencial.

Teniendo en cuenta que los alelos de *CYP2D6* (y de la mayor parte de los CYPs) no se suelen definir por una única variación polimórfica, sino más bien por una combinación de variaciones, el hecho de determinar el genotipo de las posiciones propuestas y que inicialmente se suponía permitía detectar los alelos más interesantes ligados a una modificación de la actividad del enzima, resulta útil hasta el momento en que aparezca una nueva variante alélica, definida por alguno de los SNPs ya tipados y alguno más. Esto hace que el número de SNPs necesarios para tipar correctamente un alelo determinado hoy, puede verse incrementado mañana debido a la aparición de un nuevo alelo con el que comparta uno o varios SNPs. Es decir, que para el correcto genotipado de un alelo debemos detectar no sólo las posiciones que definen a ese alelo, sino aquellas que lo diferencian de otros. Así, las posiciones elegidas resultaron insuficientes rápidamente para la interpretación correcta de los alelos.

Nos encontramos también con el problema de las duplicaciones y deleciones de *CYP2D6*, que no se puede solventar con el uso de esta técnica tal como está plan-

teada, y fue necesario por tanto la implementación paralela de otros métodos para determinar el número de copias del gen.

### 1.1.2 DETECCIÓN DE LA DUPLICACIÓN Y DELECIÓN GÉNICA POR PCR

Uno de los aspectos más relevantes del gen CYP2D6 es la aparición de varias copias de ciertos alelos en un mismo cromosoma. Si el alelo multiplicado es un alelo activo puede dar lugar a un fenotipo de metabolización ultrarrápida (UM). Los individuos que presenten este tipo de metabolismo presentan una falta de respuesta a las dosis normales de aquellos medicamentos cuya ruta metabólica implica a la enzima que codifica este gen. Si bien hasta hace poco se creía que este proceso implicaba fundamentalmente al alelo \*2, se ha visto que es también frecuente en los alelos \*1, \*4, \*10, \*35 e incluso se ha descrito en los alelos \*17 y \*31.

Partiendo de las teorías postuladas sobre la formación de las duplicaciones, explicadas anteriormente (*ver Introducción, epígrafe 6.3.2*), existen varias técnicas basadas en PCR capaces de detectar la presencia de alelos duplicados. La descrita por Lundqvist y colaboradores en 1999 utiliza una pareja de *primers*: uno específico de la región “*downstream*” de CYP2D6 y otro específico de CYP2D7. Al formarse el alelo duplicado ambas regiones se sitúan cerca en la región entre el gen CYP2D6 “original” y el CYP2D6 procedente del proceso de duplicación., de forma que la amplificación genera un fragmento de 3,5 Kb que será específico de alelos duplicados mientras que no habrá PCR en el caso de los alelos normales. El problema derivado de esta técnica es que la no detección de producto amplificado, que se atribuiría a la presencia de dos alelos “normales”, podría deberse también al fallo de la reacción de PCR. Por ello resulta más conveniente la técnica desarrollada por Steijns y colaboradores en 1998. En este caso se utiliza una PCR mediante *primers* complementarios a la región intergénica de CYP2D7-CYP2D6. Estos *primers*, amplifican la región entre los dos genes CYP2D6 de los alelos duplicados generando un fragmento de 3,6 Kb, pero también la región intergénica CYP2D7-CYP2D6 de 5, 2 Kb tanto en los alelos normales como en los duplicados. De esta forma se obtiene un fragmento que debería aparecer siempre y que se usa como control de que la reacción de amplificación ha funcionado correctamente. En el estudio se han utilizado inicialmente ambos métodos, decantándonos finalmente por el segundo por razones obvias, sin embargo no se utilizó el protocolo de amplificación utilizado por sus autores, sino que se puso a punto una PCR con un protocolo de PCR idéntico al utilizado para la amplificación del gen completo, con el fin de minimizar las reacciones necesarias por muestra.

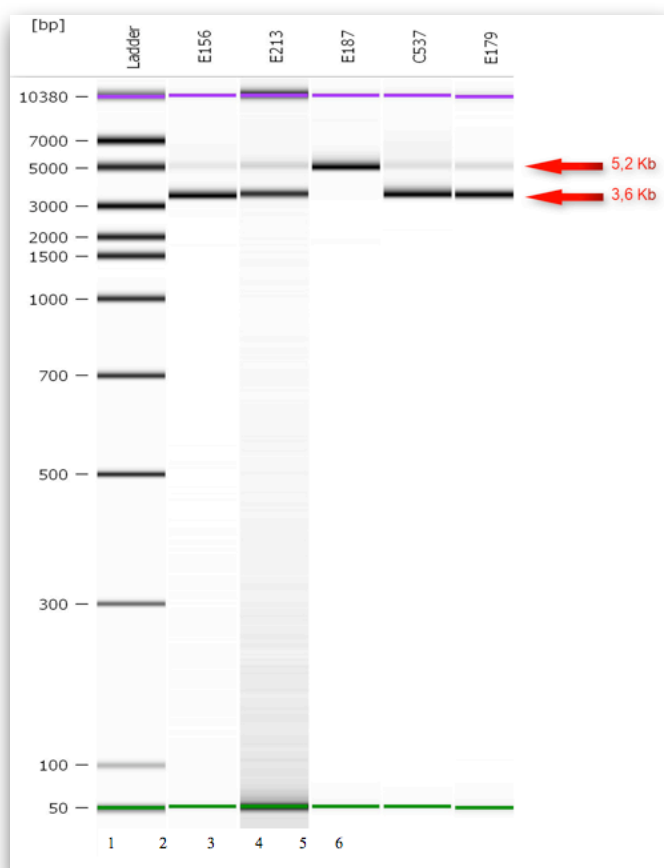


Figura 18: Detección de alelos duplicados por análisis de fragmentos. La banda de 3,6 Kb corresponde al fragmento específico de la duplicación, el de 5, 2 Kb se usa como control. Las calles 2, 3, 5 y 6 corresponden a muestras duplicadas, la 4 es una muestra normal

Por otro lado, para la detección del alelo \*5 (CYP2D6 deletado) se eligió adaptar la técnica descrita por Müller y colaboradores (2003), mediante la cual se genera por PCR un fragmento de 3,2 Kb específica de alelos deletados.

### PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

Este método de detección de alelos duplicados resulta una técnica rápida y eficiente en cuanto a que está basada en PCR y no precisa de ningún otro proceso posterior más que la visualización de los fragmentos. Además, la posibilidad de realizar la reacción de forma conjunta con la inevitable amplificación del gen completo, minimiza el tiempo utilizado por muestra, ya que en ambos casos se trata de reacciones muy largas que de realizarse por separado consumirían el doble de tiempo.

Un punto importante a tener en cuenta es que el sistema de análisis de fragmentos Agilent utilizado (ver *Materiales y Métodos*, epígrafe 2) no es un sistema de uso rutinario, debido fundamentalmente a su precio por muestra. Sin embargo resulta obvio que agiliza mucho el análisis frente al uso de otras técnicas electroforéticas como los gels de agarosa, mucho más lentos e imprecisos.

Lamentablemente la técnica tiene un punto flaco: aunque permite determinar la existencia de un alelo duplicado no permite saber de qué alelo se trata. Debido a que cabe la posibilidad de que este alelo sea un alelo no activo (como ocurre con \*4, sin actividad, o \*10 con actividad disminuida) cuya duplicación no tendría implicaciones fenotípicas, este aspecto parece bastante relevante.

Estos mismos problemas los encontramos en la detección de alelos deletados, ya que el método de detección es el mismo. Sin embargo, la PCR específica de delección presenta un problema añadido: la posibilidad de que aparezcan falsos nega-

tivos al no existir fragmento control alguno que pueda garantizar que la reacción de PCR ha funcionado correctamente en los casos en que no aparezca el fragmento de interés.

### 1.1.3 GENOTIPADO DE CYP2D6 MEDIANTE AMPLICHIP P450

Habiendo realizado ya el genotipado de *CYP2D6* por secuenciación de unas 20 muestras aproximadamente surgió la posibilidad de utilizar el Amplichip P450, una tecnología desarrollada por Roche Molecular Systems sobre la plataforma Genechip de Affymetrix. Esta técnica comercial, basada en la hibridación con chips, había sido recientemente homologada para su uso clínico por la agencia gubernamental estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*) y había sido utilizada en la práctica asistencial por equipos como el del Dr. José de León, lo cual le aporta un gran valor añadido. Por otro lado este método incrementaba el número de variables y alelos tipados, en relación a los métodos anteriormente empleados, al tiempo que solucionaba

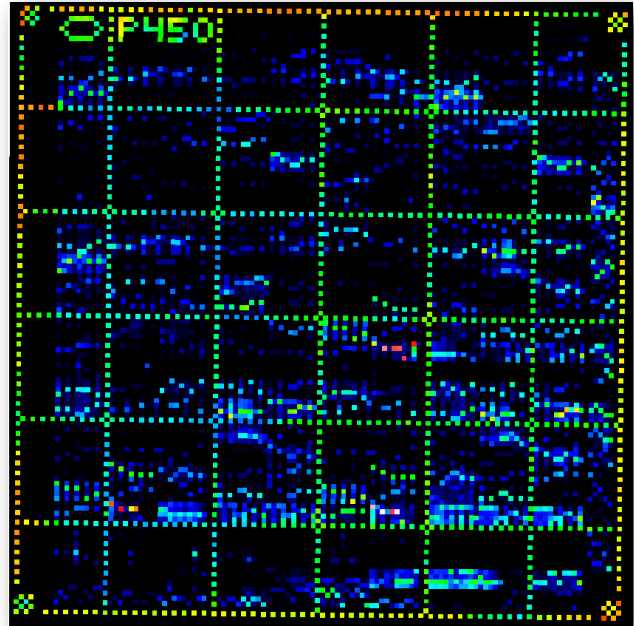


Figura 19: Captura de la lectura mediante el escáner del patrón de hibridación del Amplichip P450 para una muestra control.

dos de los problemas con los que nos habíamos enfrentado anteriormente en el genotipado de *CYP2D6*: la presencia del pseudogén *CYP2D7* y el estudio de dosis (deleciones y duplicaciones del gen completo). El Amplichip P450 permite el genotipado de los 25 alelos más importantes de *CYP2D6*, mediante el análisis de 29 variantes polimórficas (incluyendo la duplicación y la delección génica). Además combina el genotipado de este gen con el de *CYP2C19*, que pese a carecer de importancia farmacogenética en el campo de los antipsicóticos si es relevante, por ejemplo, en el de los antidepresivos tricíclicos. Una parte del análisis se realizó en los laboratorios de Progenika en Vizcaya, único laboratorio que inicialmente disponía de la plataforma en España.

El sistema de genotipado del Amplichip P450 parte de DNA extraído de sangre total, al que se le realizan dos PCRs *multiplex* simultáneas, en las cuales se amplifica

el gen *CYP2D6* completo, parte del promotor y un fragmento propio de la duplicación y la delección (así como el gen *CYP2C19*). Los productos obtenidos son fragmentados mediante DNAsa I y marcados con biotina. Posteriormente se hibridan con un chip o *array* que posee sondas específicas para cada variación. Mediante la tinción y posterior lavado del chip se consigue la diferenciación entre las posiciones hibridadas de aquellas que no lo están. Este patrón es detectado mediante un escáner e interpretado como genotipos mediante una aplicación específica. La transformación de los genotipos de las 29 variantes a los dos alelos del individuo es llevada a cabo por otro programa que ofrece también el fenotipo predicho para esa combinación de alelos.

El Amplichip P450 necesita 1 chip por cada muestra analizada y pueden analizarse 48 chips previamente hibridados (gracias a la unidad *Autoloader* del escáner), aunque la capacidad de la unidad de hibridación es de 4 muestras por cada ciclo de hibridación. El kit está optimizado para la realización de 24 reacciones de preamplificación, tinción y marcado, pero pueden realizarse menos. El tiempo empleado para la obtención del genotipo completo es de unas 7 horas por cada 4 muestras, unas 16 horas aproximadamente para 48 muestras (disponiendo de una única estación de fluidos).

### PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

El hecho de ser la única técnica de genotipado en Farmacogenética aprobada para su uso clínico por la FDA es evidentemente un factor positivo del Amplichip P450. Sin embargo éste es un requisito de no demasiada relevancia en nuestro sistema sanitario: debemos tener en cuenta que cualquier laboratorio de análisis genéticos enfocado a la práctica clínica en España utiliza técnicas que, en su mayoría no están homologadas para su uso clínico, pese a estar totalmente contrastada su eficiencia y su validez incluso mediante rigurosos controles de calidad.

Otro factor positivo, ligado a la condición comercial del Amplichip es su fiabilidad, ya que es una técnica que, al margen de estar o no homologada por la FDA, está enormemente contrastada y suficientemente probada, lo cual le confiere una enorme ventaja frente a la puesta a punto de otras técnicas alternativas. Esto es, sin embargo, un arma de doble filo: gran parte de la reproducibilidad del método se debe a las estrictas condiciones propuestas en su protocolo, muchas de las cuales suponen o pueden suponer grandes dificultades para su uso cotidiano en la realidad clínica. Una de estas restricciones es quizá la más difícilmente salvable: la naturaleza y calidad de la muestra. El protocolo del Amplichip está altamente optimizado para ser aplicado sobre una muestra de DNA extraída de sangre total bajo unos parámetros muy estrictos, desde el Kit utilizado para la extracción hasta el

tiempo que puede pasar desde la extracción de la sangre al paciente. Resulta curioso, por ejemplo el ratio de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) propuesto en el protocolo, de entre 1,50 y 1,85, ya que la pureza media de los DNAs extraídos en el laboratorio supera esos valores, (lo que indica una pureza mayor). Esto supone que, por un lado, la muestra extraída al paciente debe ser procesada en un período relativamente corto de tiempo y por otro lado la obtención del DNA deberá realizarse por una vía posiblemente diferente a muchas de las utilizadas en los laboratorios, lo cual imposibilita el uso de DNA previamente extraído por otras técnicas en otros laboratorios diferentes a aquel en el que se realiza el genotipado. En el caso de que las condiciones de la muestra no sean las establecidas, Roche no se responsabiliza del éxito o fracaso de la prueba. Esto indica que el Amplichip es una técnica con un rango de maniobra bastante estrecho.

Por otro lado, el diseño de la técnica no permite saber cuál es la causa de fallo en ciertos casos: si bien se puede (y debe) chequear las PCRs, ése resulta el único punto de control, dónde podremos saber cómo va la prueba. El chip en sí tiene controles de hibridación (patrones en forma de celda) sin embargo si estos se visualizan correctamente y aún así hay fallos en el genotipado de alguno de los SNPs (“*No Calls*”) no hay forma de saber a qué se ha podido deber el fallo. A diferencia de otros chips, las imágenes procedentes del escaneado del chip hibridado y teñido no pueden interpretarse de forma visual en el Amplichip P450 de forma que pequeños errores que suelen ser corregidos de esta forma en otras plataformas no pueden serlo en ésta.

La capacidad de procesado de muestras es bastante baja, e implica un gasto de tiempo y personal relativamente alto. Si bien las reacciones de Amplificación, Fragmentado y Marcado pueden realizarse para un número bastante alto de muestras (unas 48 teniendo en cuenta que se usa un termociclador de 96 pocillos y que la primera reacción es doble) esto no está recomendado, ya que el método parece optimizado para procesar unas 8-24 muestras por reacción. Además la estación de fluidos puede procesar únicamente 4 chips de cada vez, lo cual puede limitar temporalmente el número de muestras a analizar. Por otro lado la posibilidad de analizar menos de 4 muestras está disponible para la etapa de hibridación-tinción, sin embargo no está recomendada. En comparación con otros métodos actuales de genotipado la potencia del Amplichip no es demasiado alta y debería considerarse como una técnica capacidad media-baja (media con respecto al número de variables tipadas, baja con respecto al número de muestras).

Otro handicap que presenta este método es el relativo a la nomenclatura usada en los informes con respecto a algunas de las posibilidades de combinación de alelos de actividad reducida o nula con alelos duplicados: según el protocolo, aquellos

individuos con una copia inactiva y otra activa duplicada son considerados como Metabolizadores Extensivos. Esto sería correcto si hubiese la certeza de que el alelo sólo está duplicado. El problema es que este método no hace posible distinguir el número de copias de un gen, sólo si está multiplicado o no. Así un individuo con, pongamos, 4 copias de un alelo activo, que sería obviamente un Metabolizador Ultrarrápido, estaría tipado como Extensivo. Según los estudios existentes se han descrito hasta 13 copias del gen (Dahl et al., 1995) y aunque se supone que lo más frecuente es la duplicación simple, no existen evidencias de que este rasgo sea común a todas las poblaciones y mucho menos de que haya que pasar por alto el resto de las opciones.

### Sistema Cerrado

Lamentablemente el Amplichip P450 es un sistema cerrado. Teniendo en cuenta que la aparición tanto de nuevos genes como de nuevas variantes del CYP2D6 es frecuente, este hecho constituye una importante desventaja frente a otros métodos. La adición de nuevos genes a un panel de Farmacogenética que utilice el Amplichip supone el tener que adoptar una nueva técnica con el consiguiente gasto de tiempo y personal y fue la principal razón que nos impulsó al desarrollo de nuevas pruebas accesorias o complementarias a la de Roche. El estado de conocimiento en farmacogenética se incrementa de forma importante y es imprescindible que cualquier método aplicado permita incorporar esa información rápidamente y de forma eficiente. La posibilidad de crecimiento de una técnica es indispensable si se quiere establecer un protocolo aplicable a la realidad clínica.

### Coste

Otra enorme desventaja de esta técnica es su precio. Pese a que la introducción del Amplichip puede resultar coste-efectiva para su uso en la farmacogenética de ciertos medicamentos que utilicen de forma exclusiva o mayoritaria la vía del CYP2D6 o el CYP2C19 (como por ejemplo los antidepresivos), en el campo de los antipsicóticos es necesario el análisis farmacogenético de bastantes más genes, lo cual encarece notablemente el desarrollo de un panel compacto para estos fármacos y más si tenemos en cuenta el elevado precio por muestra de éste sistema. El gasto por paciente dedicado al genotipado de *CYP2D6* mediante el Amplichip resultaría de por sí prácticamente inasumible para un sistema sanitario como el español y a ese gasto habría que sumarle el derivado del genotipado de los otros genes.

Gran parte del precio de este sistema se atribuye al hecho de estar homologado para su uso clínico, lo cual redundará en un incremento difícilmente justificable con

respecto a la importancia de esta característica en un sistema como el español. Existen, además, alternativas mucho más coste-eficaces disponibles.

#### 1.1.4 GENOTIPADO DE CYP1A2 POR SECUENCIACIÓN.

La posibilidad de genotipar *CYP2D6* mediante el *Amplichip P450 microarray system* avivó la idea de que genotipar otros genes implicados, bien en el metabolismo, bien en la respuesta de un mayor espectro de fármacos, era imprescindible si queríamos dar una respuesta farmacogenética útil para su aplicación clínica. Además la adopción de esta tecnología nos permitió disponer de más tiempo con el que realizar el tipado de otros genes.

El abanico de tratamientos administrados a los pacientes del estudio del área sanitaria de Ourense parecía representativo de los tratamientos utilizados en la sanidad gallega y por extensión en la sanidad española: Risperidona, Olanzapina, Clozapina, Quetiapina y Ziprasidona. Sabiendo de antemano que el genotipado de *CYP2D6* sería útil para aquellos pacientes tratados únicamente con Risperidona (y Aripiprazol), y que, según las aproximaciones poblacionales (no existe en el momento de la publicación de esta tesis ningún estudio poblacional serio de *CYP2D6* en población gallega) deberíamos esperar que sólo un 5-10% de los pacientes sea Pobre Metabolizador y un 5% sea Metabolizador Ultrarrápido y teniendo en cuenta, que al resto, aquellos con un genotipo considerado como “normal” (Metabolizadores Extensivos y Metabolizadores Intermedios, con al menos un alelo de *CYP2D6* activo) no se les puede realizar ningún tipo de predicción, parecía imprescindible ampliar el número de genes del estudio.

El primer candidato que se planteó fue lógicamente *CYP1A2*: así como *CYP2D6* metaboliza Risperidona y Aripiprazol, *CYP1A2* es la principal enzima metabolizadora de Olanzapina y Clozapina, dos de los antipsicóticos atípicos más utilizados en psiquiatría. Especial relevancia tendría la Clozapina, ya que, pese a ser el antipsicótico atípico más eficiente en el tratamiento de la esquizofrenia resistente, suele ser el de última elección, debido a los efectos adversos que provoca y que requieren monitorización y vigilancia.

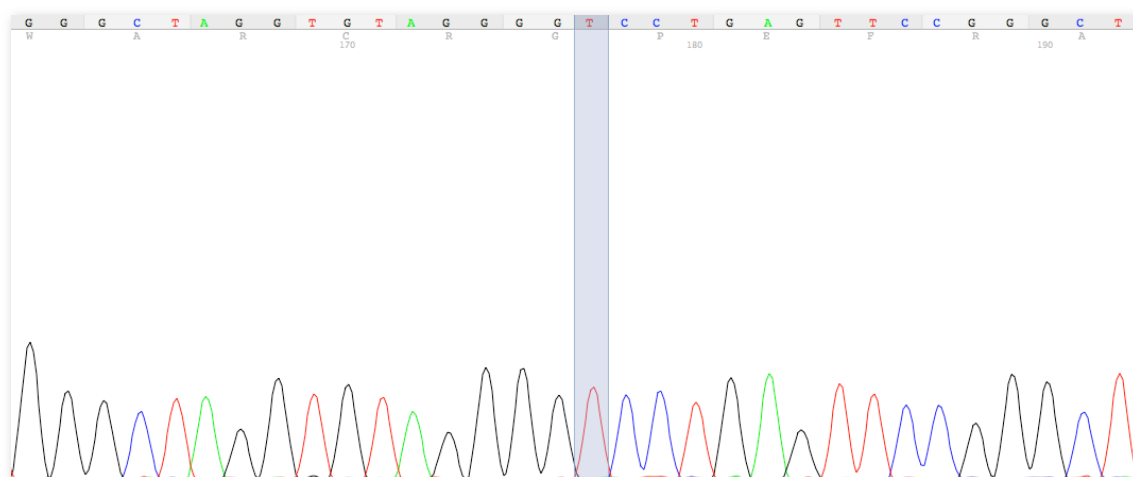


Figura 20: Electroferograma correspondiente a la secuencia del polimorfismo de CYP1A2 -739 T>G (resaltada en azul la posición: la muestra es homocigota T/T).

*CYP1A2* es un gen bastante polimórfico, sin llegar a la variabilidad de *CYP2D6*. Además su enzima se ve afectado por numerosas sustancias exógenas que pueden funcionar como activadores o como inhibidores (a diferencia de *CYP2D6*, dónde fundamentalmente aparece acción inhibidora). En el momento de la redacción de este documento la *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* ha descrito 16 alelos. Además el alelo \*1 presentaría 10 subtipos con distintas actividades metabólicas y otras 11 variantes haplotípicas en estado de predicción. Los alelos más importantes serían los alelos \*1C, \*1K, \*7 y \*11, con actividad disminuida y el \*1F con la capacidad de ser inducido incrementada. Al igual que ocurre con *CYP2D6* los alelos vienen dados por una combinación haplotípica de SNPs, con lo cual suele ser necesarios varios genotipos para definir el alelo. Como aproximación inicial se puso a punto un método de genotipado basado en la secuenciación directa que cubriese estos alelos. El sistema utiliza una PCR *multiplex* en la cual se amplifican 4 fragmentos de interés que contienen los SNPs que definen los alelos más importantes en farmacogenética \*1C, \*1F, \*1K, \*7 y \*11. Estos fragmentos son secuenciados y leídos y con la información obtenida se elaboran los genotipos.

### PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

Este método presenta las mismas ventajas e inconvenientes que apuntábamos con respecto a la secuenciación de *CYP2D6*, con el valor añadido de que este genotipado debe simultanearse con el de *CYP2D6* (inicialmente realizado por secuenciación, posteriormente mediante el Amplichip P450).

### 1.1.5 GENOTIPADO POR SNaPshot®

Mientras que la Olanzapina y la Clozapina están metabolizados fundamentalmente por la vía del ya estudiado CYP1A2, Quetiapina y Ziprasidona, otros dos de los antipsicóticos atípicos más utilizados en la muestra, lo hacen por la del CYP3A4 (y posiblemente por la del CYP3A5, debido a su enorme homología). Otros genes que parecían interesantes eran de los receptores neuronales postsinápticos: debido al mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos, con una gran afinidad por los receptores de Serotonina 5HT<sub>2</sub> (2A y 2C) frente a la afinidad presentada por los antipsicóticos típicos por los de Dopamina (fundamentalmente D<sub>2</sub>), el análisis de las variaciones en estos genes cobraba relevancia (Arranz et al., 1998a, Reynolds et al., 2005).

Estudios como los de Arranz y colaboradores apuntan además a que una combinación de estos genes y otros como el del receptor de Histamina H<sub>2</sub> y el del transportador de Serotonina 5HTT, podrían predecir la respuesta a Clozapina, el paradigma de los antipsicóticos atípicos, con una eficacia de un 76-77% (Arranz et al., 2000b)

El genotipado del gen *CYP1A2* por secuenciación resulta excesivamente lento para su uso rutinario, uno de los objetivos principales del estudio. Además, viendo la necesidad de añadir un nuevo panel de genes de relevancia farmacogenética a los ya estudiados, se planteó la búsqueda de otro método más rápido y escalable, con el cual se pudiesen tipar todas esas variaciones en una única reacción. Pese a que existían otros métodos la elección se inclinó por el SNaPshot®<sup>tm</sup>, una técnica basada en la PCR *multiplex* y minisequenciación. El SNaPshot® utiliza la amplificación de una sola base a partir de un oligonucleótido sintético de unas 20 bases, complementario a la región anexa al polimorfismo que queremos tipar y conocido como sonda. Esta sonda no está marcada, sino que se usan dideoxinucleótidos con distintos fluorocromos, que se unirán a la sonda en la reacción de extensión según sea la naturaleza del SNP a tipar. Un método basado en esta técnica es capaz de reducir notablemente el tiempo empleado frente a las técnicas tradicionales de genotipado: en aproximadamente 6 horas se obtiene el genotipo de 15 SNPs de 6 genes diferentes para 96 muestras: *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *HTR2A*, *HTR2C* y *H2*. El método parte de DNA extraído de sangre total por cualquier método de los empleados habitualmente (una cantidad relativamente reducida), al que se le realiza una PCR *multiplex*, en la cual se amplifican, a partir de 15 pares de *primers*, los 15 fragmentos que contienen los polimorfismos de interés (*ver Materiales y Métodos, epígrafe 8.2; Tabla 24*). Esta PCR puede ser chequeada mediante electroforesis con el fin de comprobar la correcta amplificación de los 15 fragmentos. Posteriormente se realiza una purificación del producto obtenido mediante incubación con Exo-Sap,

un paso previo a la reacción *multiplex* de minisequenciación o SNaPshot® propiamente dicha, en la cual se extiende un único nucleótido marcado a partir de las distintas sondas específicamente diseñadas (ver *Materiales y Métodos*, epígrafe 8.4; Tabla 25). Tras una nueva purificación con SAP se desnaturaliza la muestra y se carga en un secuenciador ABI 3730-XL de 96 capilares, donde se realiza la electroforesis de los fragmentos obtenidos. Del análisis de los electroferogramas se obtienen los distintos genotipos para cada una de las variaciones tipadas.

Así se obtuvo un método eficaz, rápido y coste efectivo complementario al genotipado de CYP2D6 mediante el Amplichip P450.

GEN	SNPs Tipados
CYP1A2	-729 c/t, 3534 g/a, -163 c/a, 558 c/a, -739 t/g, -3860 g/a
CYP3A4	-392 a/g, L293P t/c, F189S t/c
CYP3A5	6986 a/g, 14690 g/a
H2	-1018 g/a
HTR2A	102 t/c, His452Tyr c/t
HTR2C	Cys23Ser g/c

Tabla 52: SNPs tipados por SNaPshot®.

## PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

SNaPshot® es una técnica ideal para aplicar a un número medio de muestras (hasta 96 por reacción) que implica un gasto de tiempo medio-bajo. El tiempo de laboratorio empleado es de aproximadamente 6h, sin embargo hay que tener en cuenta que, si bien la obtención de los genotipos individuales de los SNPs por separado es relativamente rápida en comparación con otras técnicas, debido a la simultaneidad del genotipado de todos ellos (realizado en una sola reacción), estos genotipos han de ser leídos de forma individual y manualmente, y posteriormente deben determinarse los alelos de cada gen en el caso de que los hubiere, lo cual incrementa enormemente el tiempo empleado en emitir un genotipo completo. Aunque la realización de paneles mediante el programa GeneMapper® (Applied Biosystems) facilita mucho este proceso, no se puede evitar la lectura manual de cada una de las 15 posiciones estudiadas.

Por otro lado y lamentablemente, el SNaPshot® no es un método de genotipado de alta capacidad e incrementar en exceso el número de muestras puede resultar complicado. Con respecto a su escalabilidad podríamos decir que añadir nuevas posiciones al genotipado puede conllevar a tener que realizar una nueva reacción de *multiplex* a parte de la existente, lo cual disminuye la potencia del método a nivel de su capacidad genotipadora.

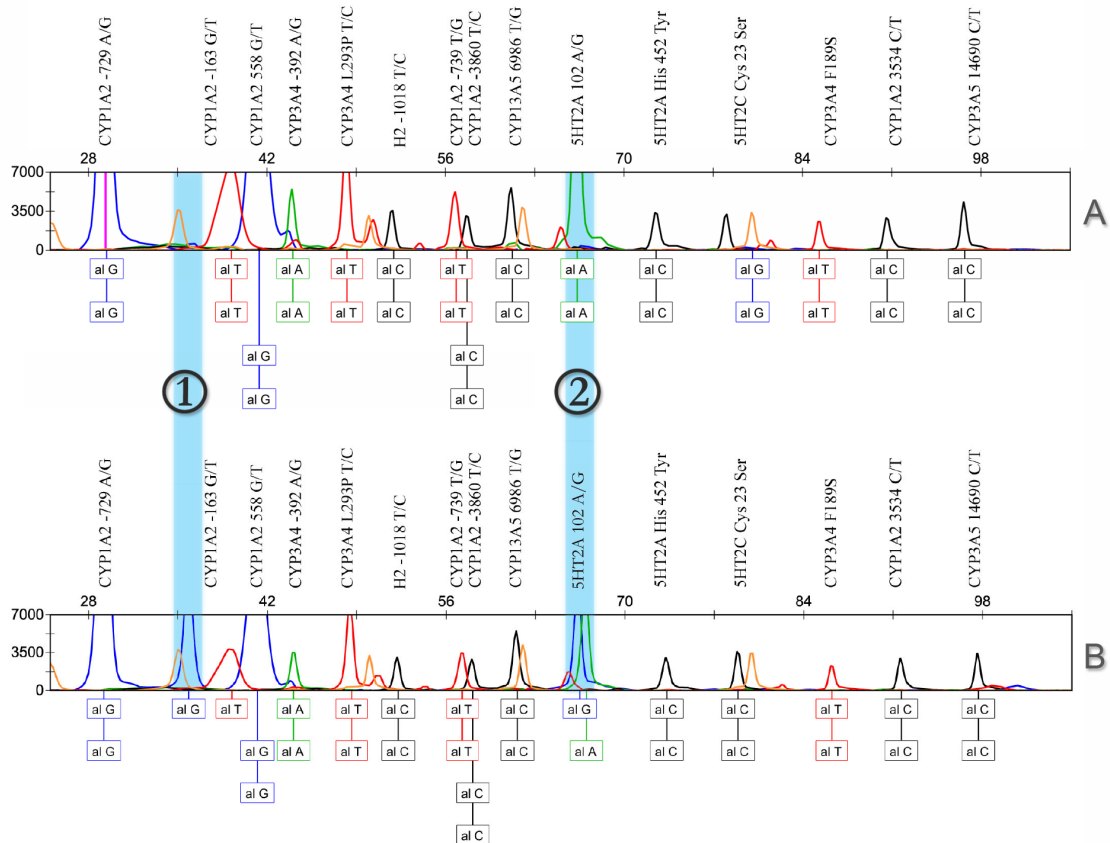


Figura 21: 1.Comparación electroferogramas SNaPshot®: la muestra A es homocigota T/T para el alelo CYP1A2 -163 G/T, mientras la B es heterocigota. 2 La A es homocigota AA para el alelo 5HT2A 102 A/G, mientras que la muestra B sería heterocigota para el mismo alelo.

## 1.2 MÉTODOS DE ALTA CAPACIDAD: SEQUENOM®

Ante la posibilidad de realizar un genotipado añadiendo un mayor número de variables polimórficas y resolver además el problema de la detección de dosis (duplicaciones y deleciones) en *CYP2D6* disminuyendo el tiempo de análisis con el fin de implementarlo en el contexto clínico habitual, se planteó dar un paso más allá en relación a la técnica adoptando un sistema de genotipado masivo, de los conocidos como "high throughput": Sequenom®. Aprovechando las ventajas de tener uno de

los nodos del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) compartiendo instalaciones con el laboratorio de Medicina Molecular, se propuso realizar un diseño que permitiese genotipar los polimorfismos de *CYP2D6* y sus variaciones de dosis así como las variables presentes en otros genes previamente estudiados mediante otras técnicas (secuenciación directa o SNaPshot®): *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *H2*, *5HT2A* y *5HT2C*. La mayor capacidad de esta técnica permitió añadir polimorfismos que no habían sido tipados anteriormente, fundamentalmente en los CYPs, donde este incremento permitiría incrementar la fiabilidad a la hora de determinar los alelos (no olvidemos que muchos de ellos son resultado de combinación haplotípica de varios SNPs).

La intención era la de realizar un panel lo más completo de polimorfismos y genes implicados en la respuesta a antipsicóticos con el fin de realizar un genotipado y poder emitir un informe en un plazo de tiempo suficientemente corto como para que resulte útil al facultativo. Recordemos que en el tratamiento de la esquizofrenia minimizar el tiempo de detección de terapia y dosis óptima es fundamental.

### Fundamentos de la técnica:

Sequenom® es una plataforma de genotipado de alto rendimiento capaz de analizar gran cantidad SNPs en gran cantidad de muestras basando su capacidad en la “multiplexación” de reacciones (capacidad de realizar la amplificación de varios fragmentos en una única reacción), el uso de placas de PCR de 384 pocillos (para lo cual es indispensable el uso de robots dispensadores) y la precisión de su sistema de análisis basado en espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Sequenom® utiliza dos reacciones: una de amplificación de los fragmentos que contienen uno o varios de los polimorfismos de interés y otra de extensión de una sola base a partir de una sonda. Debido a esto los diseños de Sequenom® para cada polimorfismo consisten en un fragmento con la base a tipar y unos 100 pares de bases a cada lado. Un software especial chequeará los posibles *primers* de PCR y las posibles *sondas* necesarias para genotipar el polimorfismo, y por ello es necesario indicar su posición mediante corchetes ([ ]) y cuál es el cambio o cambios posibles para el mismo mediante una barra (/)(por ejemplo [A/T]. Las inserciones y deleciones se indicarán utilizando el guión alto (por ejemplo [A/-] para una deleción y [-/A] para una inserción). De esta forma el programa identificará cuál es la región a amplificar y cuáles son las posibilidades de extensión de la sonda, calculando así mismo las masas en función de la base que se extienda. Para este análisis se deben introducir todos los fragmentos de todos los polimorfismos ya que el software deberá realizar las combinaciones posibles para crear ensayos o “plexes”, es decir

aquellos fragmentos que se pueden amplificar en la misma reacción de PCR (*multiplex*) y obtener el menor número de ensayos que contengan el mayor número de SNPs. La química utilizada, llamada iPlex permite conseguir “plexes” de más de 29 fragmentos por reacción (químicas anteriores como hME permitían únicamente llegar a 12).

Uno de los procesos más importantes para el desarrollo de un Chip basado en Sequenom® es el desarrollo de los diseños. Hay que tener en cuenta que se pretende genotipar un alto número de SNPs de diferentes genes y con características muy distintas. CYP2D6 necesita, por ejemplo una amplificación previa del gen completo, con el fin de eliminar la posible interacción del pseudogén en los resultados del genotipado. Así se plantearon dos ensayos diferentes: uno a partir de **DNA Genómico**, sobre el que se analizarían las variables de los genes que no precisasen preamplificación (CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, H2, HTR2A, HTR2C), y otro utilizando **DNA Preamplificado**, que se utilizaría para tipar las variantes alélicas de CYP2D6 (*ver Materiales y Métodos, epígrafe 9*).

Tras el análisis de los ensayos propuestos, el software descarta aquellos SNPs que no se pueden genotipar debido a las características de las regiones contiguas (bien sea por la presencia de otros SNPs, bien por la naturaleza de la secuencia que puede dificultar e incluso impedir la correcta unión de la sonda). En este paso hubieron de descartarse dos SNPs de los propuestos para CYP2D6: 1863RepeatInsTTTCGCCCC y 3277T>C. Ante este problema que afectaría al genotipado de los alelos \*17-\*40 y \*30-\*41 impidiendo diferenciarlos entre sí se decidió que, en caso de duda estos SNPs serían identificados por secuencia.

Otro problema diferente fue la presencia de SNPs cercanos (recordemos que CYP2D6 es un gen altamente polimórfico) parecía hacer necesaria la eliminación de otro SNP: 1039C>T. Éste SNP tiene muy cerca otro de los SNPs imprescindibles del ensayo: el 1023C>T. Ante este problema se planteó un sistema de “base alternativa” mediante el cual se diseñarían dos fragmentos: uno teniendo suponiendo que en la posición 1023 había una C y otro suponiendo que había una T (*ver Tabla 33*). De esta forma el programa podría relajar las exigencias y diseñar una sonda para cada fragmento posible, ya que por lo general evita el diseño de sondas si existe un SNP en su secuencia.

La comprobación de los resultados se realiza mediante un programa propio de la plataforma Sequenom® llamado Typer Analyzer.



Figura 22: captura de pantalla de la interfaz del programa de análisis Typer-Analyzer. En el cuadrante superior izquierdo se muestran los clusters (en este caso todos los individuos son homocigotos), en el superior derecho el electroferograma de la muestra examinada, en el inferior izquierdo los pocillos del ensayo (384 pocillos) y en el inferior derecho todos los genotipos analizados en el ensayo para una muestra determinada.

GEN	POLIMORFISMOS TIPADOS									
5HT2A	HIS452TYR	102T-C								
5HT2C	CYS23SER									
CYP1A2	-3860G-A	-739T-G	3534G-A	558C-A	634A-T	-163C-A				
CYP2C19	636G-A	681G-A								
CYP3A4	1461ins	L293P	P416L	R130Q	T185S#2	T185SmodC	T185SmodT	T363M#1	T363M#2	
CYP3A5	14690G-A	-6985A-G								
DRD2	Ser311Cys	-141C-del								
DRD3	rs1486012	rs2134655	RS6280	rs7631540	rs963468					
H2	-1018G-A									
MDR1	C3435T	G2677A-T								
nv_CYP2D6	4011	4089	4280	4398	5472	5811	3855			
nv3A4	15610_15635#1	15610_15635#2								
nvH2	1820	1940	2060							

Ensayo GENÓMICO

Tabla 33: todos los polimorfismos tipados mediante Sequenom® a partir de DNA Genómico.

Otro problema a solucionar fue el de la determinación de **dosis de CYP2D6**, uno de los puntos más importantes del estudio, ya que pueden aparecer varias copias de los alelos \*1, \*2, \*4, \*10 y \*35. Además existe un alelo \*5, que supone la delección completa del gen. Ambos eventos afectan notablemente al fenotipo metabolizador del enzima: los alelos duplicados multiplican la actividad del enzima (suponiendo que el otro alelo sea normal) y la delección la disminuye. Hasta la fecha se habían probado varios protocolos de detección de dosis basados en la amplificación de una región específica de la región intergénica formada cuando aparece una duplicación o una delección (*ver Materiales y Métodos, epígrafe 2*) y todas las muestras genotipadas como duplicadas fueron chequeadas mediante estas técnicas (Lundqvist et al., 1999).

### 1.2.1 Aproximación a dosis de CYP2D6:

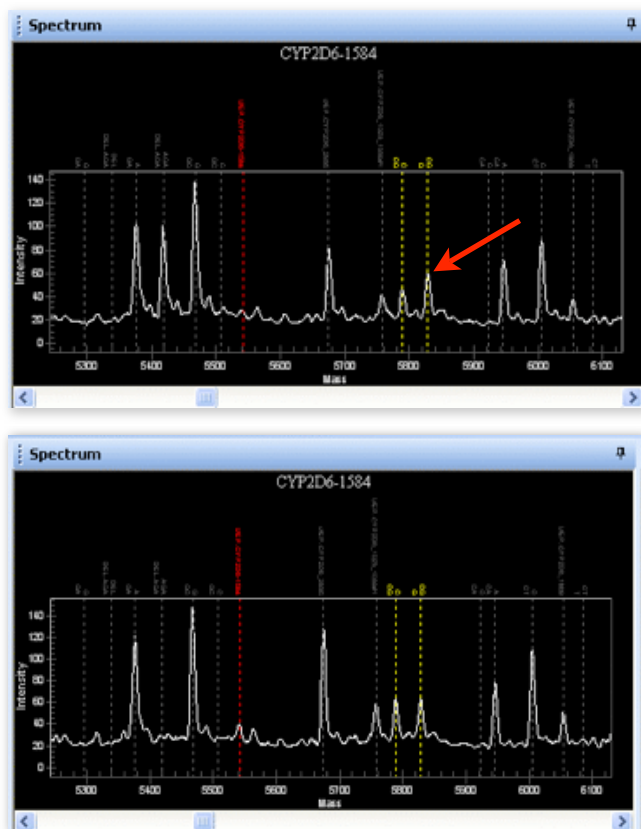
#### a) Comparación de las áreas de los picos en SNPs de CYP2D6 en heterocigosis:

Debido a la gran cantidad de SNPs analizados y al gran número de combinaciones haplotípicas posibles, la mayor parte de los individuos presentarán SNPs en heterocigosis. Estos SNPs deberían mostrar, debido a la dosis, distintas alturas según pertenezcan o no a un alelo duplicado. En un sistema ideal el alelo duplicado mostraría un área, al menos, dos veces mayor que el área del otro alelo. Hay que tener en cuenta que para este sistema se debe partir del DNA preamplificado para evitar la interferencia del pseudogén, con lo cual la muestra “sufre” tres reacciones de amplificación. Esto puede interferir en la detección de la dosis alélica, diluyendo su efecto sobre la altura final de los picos. Sin embargo, estudios anteriores parecían indicar evidencias de un posible efecto de dosis en los picos de electroferogramas de SNaPshot®.

Evidentemente este método es aplicable únicamente si el individuo es heterocigoto para alguno de los SNPs analizados, y sería conveniente que lo fuese para varios, con el fin de incrementar la fiabilidad del sistema. Afortunadamente pudimos disponer de controles normales y duplicados genotipados mediante el Amplichip P450 para el estudio de Ourense. Además se incluyeron en este ensayo varios SNPs de alta heterocigosidad presentes en las bases de datos, para evitar la posibilidad de encontrar individuos homocigotos para todos los poli-

morfismos. Esta aproximación fue confirmada en las muestras control duplicadas y delecionadas.

**b) Comparación de las áreas de los picos de nucleótidos no polimórficos que difieren entre *CYP2D6* y *CYP2D7*.**



Valiéndonos de la homología entre *CYP2D6* y su pseudogén *CYP2D7* se diseñó un novedoso sistema mediante el cual se genotiparon conjuntamente posiciones no polimórficas de ambos genes en las cuales se hubiese comprobado la falta de homología. De esta forma siempre se obtendrían heterocigotos en los cuales un alelo sería de *CYP2D6* y el otro de su pseudogén.

*Figura 25: Electroferograma de Sequenom® correspondiente a la posición no polimórfica 4398: arriba una muestra con un alelo de *CYP2D6* duplicado, abajo una muestra normal. Se observa que el pico correspondiente a *CYP2D6* (el de la derecha) incrementa su tamaño frente al de *CYP2D7* (el de la izquierda) en la muestra duplicada.*

Suponiendo que en *CYP2D7* no hay efecto de dosis, el área correspondiente a *CYP2D6* debería ser similar a la de *CYP2D7* en individuos normales, sin alelos duplicados o delecionados, mientras que la relación cambiaría en el caso de existir duplicación incrementándose el de *CYP2D6*. En el caso de existir una deleción sería de esperar que la relación fuese a la inversa. Dado que el software de análisis de Sequenom® realiza una lectura de las áreas de los picos resultantes de la lectura, se trata de realizar una comparación estadística del alelo correspondiente a *CYP2D6* y del correspondiente a *CYP2D7*, teniendo en cuenta que gracias al genotipado previo de la muestra de Ourense dispusimos de controles duplicados y delecionados. Para encontrar estas posiciones se realizó una comparación guiada por software (BLAST) entre la secuencia de *CYP2D6* (M38888) y la de *CYP2D7* (DQ21135).

Esta aproximación fue confirmada en las muestras control duplicadas y delecionadas.

Query	1908	TGCCACGGTGGGGGGCAAGGGTGGTGGGTTGA	CGTCCCAGGAGGAATGAGGGGAGGCTG	1967	CYP2D6
Sbjct	2761	TGCCACGGTGGGGGGCAAGGGTGGTGGGTTGA	CGTCCCAGGAGGAATGAGGGGAGGCTG	2820	CYP2D7

Figura 24: Resultado Comparación entre secuencias de CYP2D6 y CYP2D7 (Blast). El nucleótido resaltado corresponde a la posición 4208 de CYP2D6 que corresponde a una Guanina. El nucleótido correspondiente para CYP2D7 sería Adenina.

**c) Comparación de áreas de picos de posiciones no polimórficas de CYP2D6 y posiciones no polimórficas de otros genes.**

Para ello se eligieron las mismas posiciones no polimórficas usadas en la comparación CYP2D6 / CYP2D7 como posiciones no variables de CYP2D6 y varias posiciones no polimórficas de genes incluidos en el estudio: H2 y CYP3A4. Este sistema sería equivalente al de comparación de CYP2D6 / CYP2D7 y se aproxima también a la técnica del MLPA (ver NV en Tabla 27).

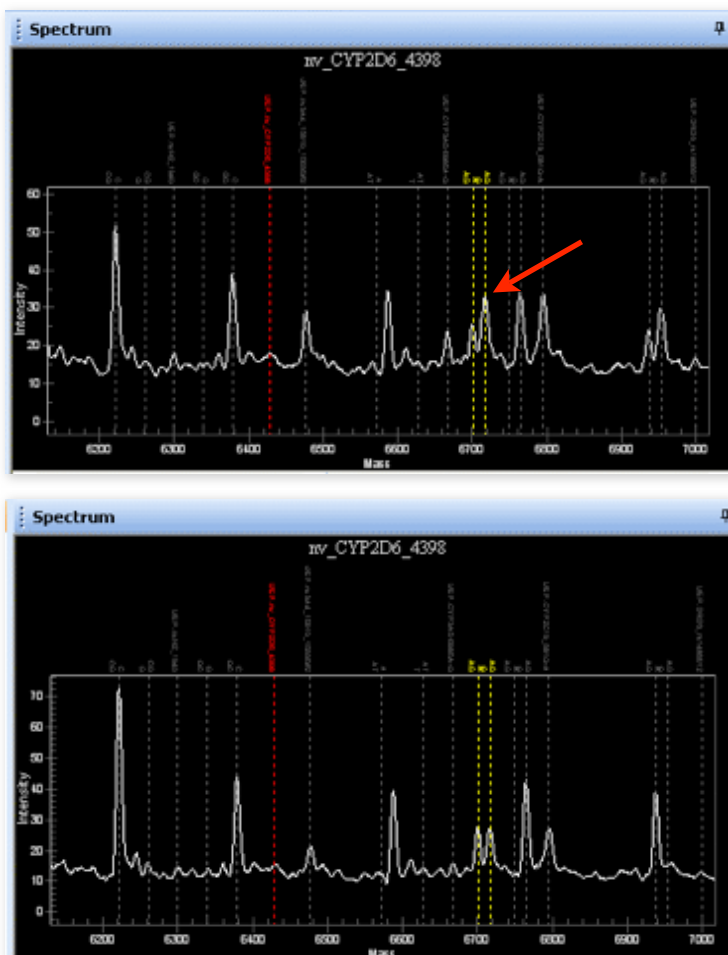


Figura 25: Electroferograma de Sequenom® correspondiente a la posición no polimórfica 4398: arriba una muestra con un alelo de CYP2D6 duplicado, debajo una muestra normal. Se observa que el pico correspondiente a CYP2D6 (el de la derecha) incrementa su tamaño frente al de CYP2D7 (el de la izquierda) en la muestra duplicada.

Por otro lado deberíamos garantizar que el pseudogén CYP2D7 no interferiría en el genotipado de CYP2D6. En otros protocolos de tipado de este gen se utiliza una

PCR previa específica de *CYP2D6*, valiéndose de las regiones no homólogas entre ambos genes. De hecho, este sistema ya había sido utilizado durante el genotipado por secuenciación directa. Sin embargo, en todos los casos se dejaba aparte el SNP -1584C>G, situado en la región promotora, SNP interesante y necesario para la determinación alélica de *CYP2D6*. Se decidió diseñar un nuevo *primer* “forward” para, junto al *primer* “reverse” ya utilizado anteriormente, amplificar un fragmento de 6237 bps que contuviese el gen completo y parte del promotor.

### 1.2.2 Automatización del Análisis de Datos:

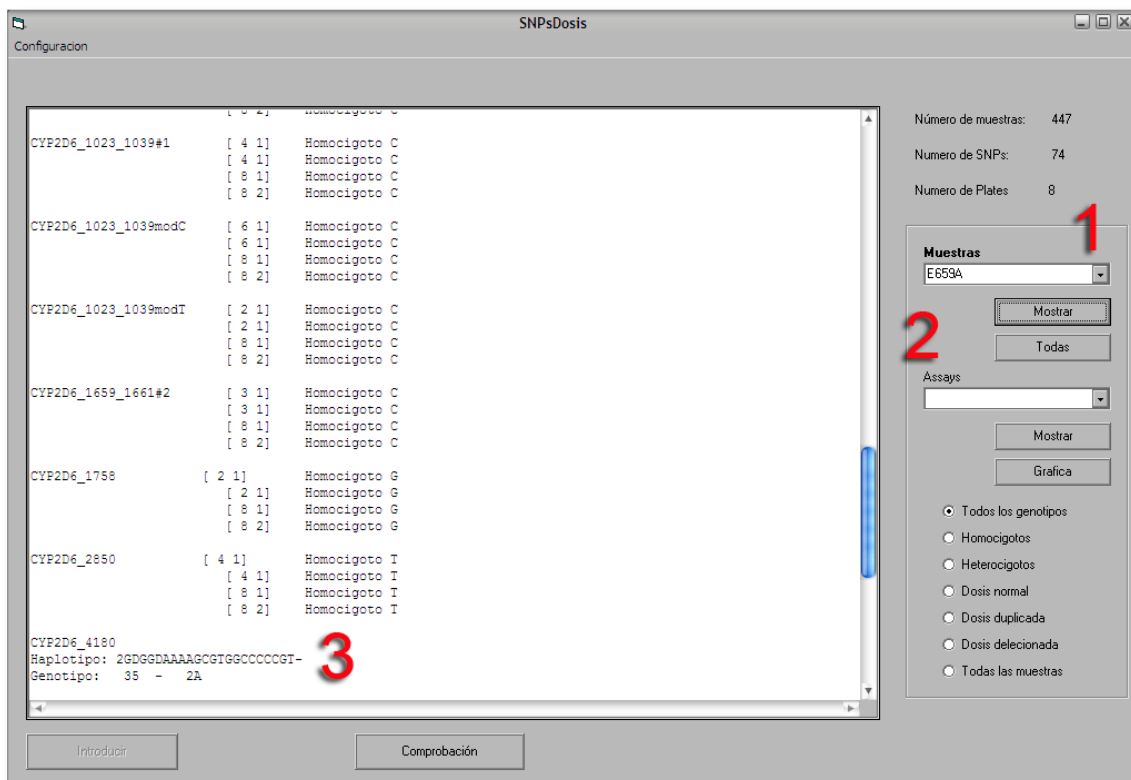


Figura 26: Captura de pantalla de la interfaz principal del software de análisis desarrollado. 1. Entrada de muestra. 2. Menú de elección de ensayo. 3. Resultados: se muestran los genotipos de cada SNP tipado, el Haplotype correspondiente y finalmente Genotipo de la muestra (Ambos alelos).

Dado el gran número de SNPs tipados en *CYP2D6* (26), así como la enorme variabilidad de combinaciones haplotípicas posibles, es necesario un sistema automatizado de lectura y análisis de los datos que admita un gran número de ensayos simultáneos y que evite errores en la identificación transcripción e interpretación de los datos.

A tal efecto se ha desarrollado una herramienta “a medida” específica basada en el lenguaje “*Visual Basic*” para Windows de Microsoft. Dicho software realiza una búsqueda directa en la base de datos de la plataforma Sequenom® (evitando problemas de traslación), y una comprobación de los datos básicos de calidad, altura de los picos, nombre del SNP y genotipo para cada muestra. A partir de estas variables se realiza una interpretación automática de dicha información emitiéndose un genotipo para cada individuo (*ver Figura 26*).

Paralelamente se incluyó una rutina que emplea la información de la altura de los picos de cada alelo de distintos SNPs seleccionados, normalizándola con respecto a muestras control (previamente genotipadas) sin duplicaciones ni deleciones para CYP2D6. Esto permite realizar un diagnóstico de dosis analizando los tres supuestos de detección anteriormente descritos (*Epígrafe 1.2.1*), definidos por los SNPs implicados en cada uno. Este diagnóstico se expresa en forma de un ratio en porcentaje que es indicativo del estado de dosis. De esta forma disponemos de tres análisis diferentes e independientes, formados a su vez por varias estimas correspondientes a cada uno de los SNP estudiados, lo cual se traduce en un ensayo seguro y rápido.

### 1.2.3 PROS Y CONTRAS DE LA TÉCNICA:

Las ventajas de un método de genotipado de alta capacidad son evidentes: es posible analizar un elevado número de polimorfismos a un elevado número de muestras en un período de tiempo relativamente corto. La optimización de los métodos para el análisis de un gran número de pacientes en una única reacción abarata enormemente los costes por muestra. Sequenom® cumple estos criterios y su química tiene, además, un coste relativamente bajo, lo cual permite realizar el genotipado de un paciente a un precio que hace que su implementación rutinaria resulte realmente coste-efectiva para un sistema sanitario de las características del gallego. Se estima que el tiempo que precisa la plataforma para realizar el genotipado de los distintos ensayos (cada uno de los cuales contiene hasta 384 muestras), ya que los análisis se sustentan en las infraestructuras del Centro Español de Genotipado, es de aproximadamente 3 días. Suponiendo que el tiempo máximo en el cual se debe emitir un informe farmacogenético para que éste resulte útil para el psiquiatra, a fin de que se puedan tener en cuenta las predicciones realizadas siguiendo el genotipo a la hora de elegir el tratamiento, es de aproximadamente una semana (durante la cual el paciente pasa la fase aguda de la enfermedad y se estabiliza), el tiempo empleado en el genotipado mediante la tecnología utilizada por Sequenom® es realmente aceptable. Por otro lado, la incorporación de nuevos marcadores farma-

cogenéticos tanto para los genes ya existentes como de nuevos genes es relativamente sencilla. Sequenom® es un método fácilmente escalable que, de hecho, puede resultar tanto o más barato y tanto o más efectivo cuantos más polimorfismos se tipen.

Otra ventaja del método, debida a la naturaleza de la técnica es la posibilidad de realizar réplicas de cada muestra, en el mismo ensayo o en ensayos diferentes, con lo que se puede incrementar muchísimo la fiabilidad del genotipado. Esto no es posible en otras técnicas como el Amplichip, en el cual deberemos utilizar un nuevo chip si queremos realizar una réplica. En Sequenom® es recomendable replicar la misma muestra, al menos una vez en cada placa o ensayo, sin que ello encarezca el genotipado de forma importante.

Como desventajas podemos resaltar las derivadas de ser un método de reciente puesta en marcha. En comparación con los métodos comerciales con licencia para su aplicación clínica, como el Amplichip P450, esta técnica basada en MALDI-TOF-Sequenom® precisa la optimización y validación necesaria para todo método que se pone en marcha, y no dispone de la comodidad que ofrece haber sido previamente testado y validado. Por suerte la existencia de muestras previamente genotipadas mediante otras técnicas como SNaPshot®, Secuenciación o incluso el mismo Amplichip de Roche en el estudio de Ourense, permiten la validación del método y la determinación de su grado de sensibilidad y especificidad. Todos los genotipos de las muestras control analizadas en la puesta en marcha de este método fueron contrastados mediante técnicas alternativas.

Existen también dificultades relativas al genotipado de CYP2D6; por un lado se debe tener en cuenta la calidad de la muestra, que debe ser suficiente para permitir la amplificación del fragmento de DNA de unas 6,2 Kb, aunque en ningún momento las exigencias al respecto se acercan a las estipuladas por otros métodos como el de Roche. Por otro lado la determinación de los alelos a partir de los genotipos individuales de cada polimorfismo genotipado, teniendo en cuenta la gran cantidad de combinaciones haplotípicas posibles, es difícilmente realizable a mano, y requiere de un método automatizado de interpretación de los haplotipos. Este software ya está presente en las alternativas comerciales utilizadas anteriormente, pero en este caso fue necesario su desarrollo y validación. Para ello se optimizó aprovechando el estudio realizado sobre las 400 muestras de Brasil, muestras suficientes para poner a punto este software de análisis y detectar las posibles dificultades que pudiesen surgir a la hora de aplicarlo al día a día clínico. Curiosamente el hecho de ser un sistema de análisis creado para la ocasión confiere al genotipado por Sequenom® una pequeña ventaja sobre el método de Roche: el software del Amplichip P450

denomina “*No Call*” a toda muestra de la cual no es capaz de emitir un genotipo completo. El fallo de un único SNP que diferencie dos alelos implica directamente un “*No Call*” y para identificar cuáles son los alelos posibles debemos analizar “a ojo” los resultados individuales del genotipado. El software desarrollado indica, en función de los genotipos obtenidos, aunque estos no estén completos, cuales son los alelos posibles. Esta información puede resultar de mucha ayuda, ya que es posible que todas las opciones correspondan a un fenotipo predictivo idéntico y no sea necesario determinar de cuál de los alelos posibles se trata, o bien, localizar cuál o cuáles de los SNPs determinan uno u otro alelo y utilizar una técnica alternativa de rescate.

## 2. ELABORACIÓN DE UNA TABLA DE PREDICCIONES:

Suponiendo que un análisis farmacogenético fuese tan simple como el diagnóstico de una enfermedad monogénica, el test farmacogenético a utilizar podría aplicarse de una forma inmediata: el paciente es susceptible o no es susceptible al fármaco en cuestión. No se puede esperar, sin embargo, que la respuesta a fármacos sea un rasgo genético simple, sino que, en la mayoría de los casos esperaremos que se comporte como uno poligenético complejo. Todos y cada uno de los genes implicados en la acción de un medicamento tendrán distintos grados de participación; algunos muy fuerte, otros apenas mensurable. La realización de un test farmacogenético único se reserva a unos cuantos casos (como el relacionado con el UGT1A1 y el Irinotecan), pero por lo general y especialmente en el caso que nos ocupa, los tratamientos antipsicóticos, esta visión no parece realista. El conocimiento en este campo es, además, claramente insuficiente: muchas de las asociaciones descritas no están validadas o todavía carecen de evidencias suficientes que las apoyen. Las muestras de pacientes suelen ser poco homogéneas tanto en los criterios clínicos como en su origen poblacional y, debido a que en las poblaciones reales la comedición parece la norma, debemos tener en cuenta que las interacciones entre medicamentos son factores que pueden enturbiar cualquier estudio farmacogenético y su importancia debe, por tanto, ser tenida en cuenta. La realidad de la esquizofrenia nos muestra un gran número de tratamientos distintos cada uno de los cuales utilizaría una u otra vía de actuación, implicando a uno u otro gen de los estudiados, fundamentalmente en lo que a enzimas metabolizadores se refiere

Dado que la respuesta a fármacos debe ser entendida como un proceso global en el que intervienen distintos enzimas implicados tanto en la farmacocinética como

en la farmacodinámica, parece lógico pensar que cualquier aproximación farmacogenética a un grupo determinado de medicamentos deba ser entendida de una forma igualmente global. Debe realizarse un programa integral, que permita el análisis del mayor número posible de factores genéticos implicados (teniendo en cuenta que los ambientales son difícilmente analizables en la mayoría de los casos) y necesitaremos, por tanto, una herramienta de interpretación global y que nos permita además comprobar la eficacia del programa en si. Si únicamente pensamos en la validación de los marcadores para los que se ha encontrado asociación, no es verosímil que tengamos nunca ningún proyecto que aporte el número suficiente de muestras dada la tremenda cantidad de subgrupos estadísticos que se generarían. Es por ello que para la realización de cualquier programa de farmacogenética proponemos como necesaria la elaboración de una tabla de predicciones global, que atienda en su conjunto a toda la información que proporcionan los genes implicados. Dicha tabla debe ser entendida como un algoritmo cuya función es sistematizar la información relevante de los genes utilizados en el test y que resulta en una afirmación única (el paciente responderá, no responderá, desarrollará reacciones adversas para este u otro fármaco...) que será en última instancia verdadera o falsa y por tanto verificable. Esto solventa el problema de los subgrupos por un lado y permite analizar la validez del programa de forma estadísticamente sencilla por otro, facilitando la posibilidad de ensayos clínicos clásicos.

Para la realización de las predicciones es imprescindible un examen exhaustivo de la bibliografía existente hasta la fecha y, como ocurre normalmente, existen divergencias sobre la idoneidad de algunos de los marcadores elegidos para su uso farmacogenético según unos u otros autores. La mayor parte de la literatura existente está basada en estudios de asociación de dichos marcadores con la respuesta o la presencia de efectos secundarios en las poblaciones de estudio. Algunas de las asociaciones encontradas son indirectas, es decir: se ha demostrado la relación del gen con el metabolismo o acción del medicamento y la relación de un polimorfismo con la actividad del gen, pero no se ha comprobado que exista asociación del polimorfismo con la respuesta al fármaco o la aparición de reacciones adversas al mismo. Los criterios utilizados para optar por unos u otros estudios han sido fundamentalmente su rigurosidad, el número de muestras analizado, la presencia de evidencias fisiológicas o estudios *in vitro* sobre la implicación de las variaciones estudiadas en la actividad del enzima y de la implicación de los enzimas en el metabolismo-actuación del fármaco en cuestión y, por supuesto, la existencia de réplicas de los estudios. La mayor parte de los resultados analizados pierden potencia estadística por la baja frecuencia de los marcadores y por la dificultad de obtener muestras suficientes para obtener significación estadística. No olvidemos que se trata de una población (la esquizofrénica) en la que las dificultades para obtener

colaboración son muy superiores a las que pueden aparecer en los estudios de otras patologías. Así, parece que el único método capaz de reunir las muestras suficientes es en muchos casos la realización de metaanálisis.

La aplicación práctica de la farmacogenética debe tener como base estos estudios ya realizados y toda la información previa existente. Si esta es aún incompleta (como parece el caso actual para muchos de los marcadores) las tablas de predicciones serán meramente tentativas, pero permiten sistematizar el empleo de lo ya conocido, facilitando su perfeccionamiento mediante la acumulación de casos y el incremento del conocimiento. La vía lógica para la comprobación de la validez de estas tablas de predicciones es su aplicación a estudios piloto que, bien diseñados, permitirían contrastar los resultados de las previsiones con los datos reales de respuesta y ver si la existencia de un programa farmacogenético puede contribuir a mejorar la aplicación de los tratamientos en la práctica clínica.

## 2.1 PREDICCIONES PARCIALES.

### 2.1.1 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT<sub>2C</sub> (HT<sub>2R2C</sub>) Y SU VARIANTE CYS 23 SER.

Se eligió el polimorfismo Cys23Ser del gen *HTR2C* para formar parte del panel de Farmacogenética de Antipsicóticos por la enorme relevancia del gen en la acción de dos de los fármacos más relevantes en el tratamiento de la esquizofrenia: Clozapina y Olanzapina. Pese a que se ignora el cambio de función que supone esta variación en la estructura del receptor, los estudios existentes relacionando la presencia del alelo 23Ser con una mejor respuesta, en especial el estudio de Sodhi y colaboradores y el metaanálisis de 2000 siguen siendo referentes suficientes como para añadir este polimorfismo al estudio. Se barajó la posibilidad de incluir también el polimorfismo de repetición del promotor, pero finalmente no se hizo. No descartamos incluirlo en próximas versiones.

Partiendo de las evidencias encontradas en la literatura (estudios de asociación farmacogenética), la predicción emitida con respecto a la variable estudiada de este gen es: *“Los pacientes con el alelo 23Ser (68C) del gen HTR2C en Homocigosis responderán bien a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina”*. Debido a la ausencia de estudios sobre el efecto de la mutación sobre la actividad del receptor en vivo, la fiabilidad de esta predicción es menor que otras emitidas con respecto a otras va-

riables de otros genes. (Veenstra-Van derWeele et al., 2000, Sodhi et al., 1995, Arranz et al., 2000a).

### 2.1.2 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT<sub>2A</sub> (HTR2A) Y SU VARIANTE HIS452TYR.

Según los estudios antes citados tanto a nivel de estudios de asociación como de cambios en la funcionalidad del receptor, la predicción relativa a esta mutación sería la siguiente: *“Los pacientes con el alelo 452TYR del gen HTR2A en Homocigosis responderán mal a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina”*. Teniendo en cuenta que los estudios de asociación de este alelo con la falta de respuesta están apoyados por la existencia de estudios funcionales sobre cómo afecta este cambio tanto a la estructura como a la actividad del receptor, la fiabilidad de esta predicción se ve incrementada con respecto a las de genes donde sólo existen estudios de asociación. (Arranz et al., 1995, Arranz et al., 1998b, Masellis et al., 1998, Hazelwood et al., 2004, Arranz et al., 2000a)

### 2.1.3 GEN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT<sub>2A</sub> (HTR2A) Y SU VARIANTE 102C/T.

La predicción basada en los datos obtenidos de los distintos estudios (Arranz et al., 1995, 1996, 1998a, 2000a- b) con respecto a este polimorfismo sería: *“Los pacientes con el alelo 102C en Homocigosis del gen HTR2A responderán mal a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina”*. A diferencia del polimorfismo anterior, His452Tyr, 102C/T es un SNP sinónimo, lo cual implica que, pese a que exista una asociación con la respuesta a antipsicóticos, esta no es causal. Además la co-segregación de este SNP con el del promotor -1438 A/G, aunque demostrada, puede variar entre poblaciones, con lo que, suponiendo que esta última variación cause una disminución en la expresión del gen y por tanto en su actividad (este punto no está contrastado), no resulta un dato totalmente fiable a no ser que sea respaldado por un estudio poblacional de análisis de ligamiento. Así, la fiabilidad de esta predicción se ve limitada con respecto a, por ejemplo, la de His452Tyr.

## 2.1.4 GEN DEL RECEPTOR DE HISTAMINA H2 Y SU VARIANTE -1018 G>A.

Basándonos en los estudios citados anteriormente (Mancama et al., 2002, Arranz et al., 2000) se elaboró la siguiente predicción: *“Los pacientes con el alelo -1018 A del gen H2 responderán bien a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina”*. Naturalmente esta predicción es fiable en tanto en cuanto existen estudios de asociación al respecto. Lamentablemente no existe ningún estudio de cómo esta mutación en el promotor modifica la expresión de este gen, pese a que si se ha demostrado su implicación en el mecanismo de acción de los antipsicóticos.

## 2.1.5 GEN CYP1A2 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.

Debido a que los estudios se basan en los alelos, las predicciones realizadas se refieren a ellos en lugar de hacerlo a SNPs:

### a) ALELO \*1F.

Debido a la presencia de este alelo el enzima presenta una inductibilidad mayor frente a inductores tales como el tabaco, lo cual afectará a su estatus metabolizador, de forma que los individuos con este genotipo que estén afectados por algún inductor se comportarán como metabolizadores ultrarrápidos y por tanto no responderán a dosis normales de aquellos antipsicóticos metabolizados por la vía de CYP1A2 (Han et al., 2002, Sachse et al. 1999). Así pues la predicción con respecto a este alelo sería: *“Los pacientes fumadores con el alelo \*1F del gen CYP1A2 en Homocigosis no responderán a dosis normales de Clozapina y Olanzapina”*. Posiblemente esta predicción pueda ampliarse con respecto al uso de otros inductores de CYP1A2, como puede ser el Omeprazol. Esta predicción se ve limitada por el hecho de que, pese a que el incremento de inductibilidad debida al genotipo \*1F/\*1F ha sido suficientemente probado (Eap et al., 2004), los estudios de asociación de este alelo con una incremento del metabolismo de la Clozapina en fumadores no han resultado concluyentes (Van der Weide et al., 2003).

### b) ALELOS \*1C, \*1K, \*7 Y \*11.

Según los estudios (Aklillu et al., 2003, Allorge et al., 2003, Nakajima et al., 1999) estos alelos condicionan una actividad metabólica reducida del enzima CYP1A2. Así pues la presencia de dos de ellos bien en homocigosis bien por com-

binación redundará en un fenotipo predictivo equivalente al de pobre metabolizador. Así la predicción al respecto sería: *“Los pacientes con dos alelos \*1C, \*1K, \*7 o \*11 del gen CYP1A2 presentarán efectos secundarios con dosis normales de Clozapina y Olanzapina”*.

### 2.1.6 GEN CYP3A4 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.

Los estudios analizados determinan que el alelo \*17 confiere a CYP3A4 una actividad metabólica menor a la normal, mientras que el \*18A confiere un incremento a la actividad del enzima (Dai et al., 2001). Así la predicción realizada con respecto a estas dos variables, teniendo en cuenta que CYP3A4 es la vía metabólica para los antipsicóticos Quetiapina y Ziprasidona sería: *“Los pacientes con el alelo \*17 del gen CYP3A4 en Homozigosis presentarán efectos secundarios con dosis normales de Quetiapina y Ziprasidona”* y *“Los pacientes Homozigotos para el alelo \*18A del gen CYP3A4 no responderán a las dosis normales de Quetiapina y Ziprasidona”*.

Si bien está suficientemente demostrada la relación entre este citocromo y estos dos antipsicóticos y el efecto de los alelos sobre la actividad del enzima, esta predicción está limitada por la falta de estudios de asociación directa entre la presencia de estas variables y el metabolismo de Quetiapina o Ziprasidona. Hay que tener en cuenta que ambos antipsicóticos se encuentran entre los menos utilizados para el tratamiento de la psicosis derivada de la esquizofrenia.

### 2.1.7 GEN CYP3A5 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS.

El isozima CYP3A5 podría tener un papel muy importante en el metabolismo hepático de los 3A, fundamentalmente su alelo \*1, que es el único de entre los que aparecen en población caucásica que presenta una actividad normal. Sin embargo, en la población española, al igual que en la mayoría de las poblaciones caucásicas la frecuencia de este alelo es muy baja: sólo un 2,8% de los españoles presentan este alelo en Homozigosis, mientras que el resto no expresarían CYP3A5 (Gervasini et al., 2005), al menos en hígado.

Los alelos más frecuentes \*6 y \*3 aportan un metabolismo disminuido al enzima. Teniendo en cuenta por tanto que la mayor parte de la población (un 97,2%) posee una actividad reducida, es de esperar que las dosis medias de los tratamientos establecidas bien por la casa farmacéutica, bien mediante la observación y experiencia clínica de los psiquiatras, estén deducidas para esa parte mayoritaria de

la población, con lo cual, el hecho de expresar CYP3A5 a nivel hepático, gracias al alelo \*1, conferiría un incremento en la actividad de los 3A con respecto a lo habitual, con lo cual la predicción quedaría de la siguiente forma: ***“Los pacientes con el alelo \*1 del gen CYP3A5 en homocigosis no responderán correctamente a Quetiapina o Ziprasidona”***. Al igual que ocurre con CYP3A4, tampoco existen estudios que asocien directamente las diferencias en actividad de CYP3A5 producidas por variantes alélicas y la diferencia en respuesta a estos antipsicóticos. Habría que tener en cuenta que el metabolismo de estos fármacos puede utilizar tanto la vía del 3A4 como la del 3A5 (Williams et al., 2003), con lo cual ambas predicciones deben contemplarse de forma paralela. Si un individuo presenta un alelo \*17 de CYP3A4 en homocigosis (sería equivalente a un PM), pero el homocigoto para el alelo \*1 de CYP3A5 es posible que presente un metabolismo normal, ya que utilizaría la vía del 3A5 en lugar de la habitual del 3A4.

### 2.1.7 GEN CYP2D6 Y SUS VARIANTES ALÉLICAS

CYP2D6 es posiblemente el gen del que existen más estudios farmacogenéticos. Tanto los estudios caso-control de Bork y colaboradores en 1999 como los posteriormente realizados por De León y colaboradores (De Leon et al., 2005) y sucesivas revisiones; Spina et al., 2007) indican que la relación entre los distintos metabolismos predichos a partir del genotipado en función de sus alelos y la respuesta a la Risperidona es suficientemente potente como para el uso del genotipado de este gen como predictor de respuesta (de Leon et al., 2006). Las predicciones realizadas al respecto serían: ***“Los pacientes con un fenotipo predictivo Pobre Metabolizador (PM) para CYP2D6 desarrollarán reacciones adversas a dosis normales de Risperidona”*** y ***“Los pacientes con un fenotipo predictivo Metabolizador Ultrarrápido (UM) para CYP2D6 no responderán a las dosis habituales de Risperidona”***.

Hay que tener en cuenta que predicciones como la realizada con respecto a los pobres metabolizadores tienen una alta especificidad (>90%), pero una baja sensibilidad (10-20%). Esto quiere decir que, aunque casi todos los pacientes PMs desarrollen reacciones adversas a la Risperidona, sólo un 10-20% de los que presentan reacciones adversas son PMs y posiblemente algo similar ocurra con los UMs. Actualmente el genotipado de CYP2D6 ya se plantea como una opción recomendable previa a la elección de un tratamiento.

RECEPTOR 5HT2C	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con el alelo 23Ser (68C) en Homocigosis	Responderán bien a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina
RECEPTOR 5HT2A	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con el alelo 102C en Homocigosis	Responderán mal a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina
Pacientes con el alelo Tyr452 en Homocigosis	Responderán mal a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina
RECEPTOR H2	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con el alelo -1018 A	Responderán bien a las dosis medias de Clozapina y Olanzapina
CYP1A2	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes fumadores con el alelo *1F en Homocigosis	No responderán a dosis normales de Clozapina y Olanzapina
Pacientes con dos alelos *1C, *1K, *7 o *11	Presentarán efectos secundarios con dosis normales de Clozapina y Olanzapina
CYP3A4	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con el alelo *17 en Homocigosis	Presentarán efectos secundarios con dosis normales de Quetiapina y Ziprasidona
Pacientes Homocigotos para el alelo *18A	No responderán a las dosis normales de Quetiapina y Ziprasidona
CYP3A5	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con el alelo *1 en homocigosis	No responderán correctamente a Quetiapina o Ziprasidona
CYP2D6	PREDICCIÓN PARCIAL
Pacientes con un fenotipo predictivo Metabolizador Ultrarrápido (UM)	No responderán a las dosis habituales de Risperidona
Pacientes con un fenotipo predictivo Pobre Metabolizador (PM)	Presentarán efectos secundarios con dosis normales de Risperidona

Tabla 34: Resumen de las predicciones parciales para cada gen / variante analizada.

## 2.2 PREDICCIONES GLOBALES POR MEDICAMENTO

Es interesante el hecho de que, tal como está planteado el estudio cabe la posibilidad de que un paciente en cuestión cumpla una predicción para un gen en concreto y falle en otra predicción y todo ello tenga una coherencia biológica. Esto se explica si tenemos en cuenta que disponemos de dos tipos de genes en el panel de genotipado y en la tabla de predicciones: genes implicados en el **metabolismo** (los CYPs), que regulan la biodisponibilidad del fármaco y genes, y genes implicados en la **mecanismo de acción** del medicamento, genes que codifican los receptores

diana que median el efecto terapéutico de los antipsicóticos (receptores de serotonina, receptores de histamina). Esto es realmente un reflejo del funcionamiento de los fármacos y de dos entidades implicadas en el mismo: Farmacocinética (aplicada a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos) y Farmacodinámica (aplicada a los efectos fisiológicos y bioquímicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción).

Así en un paciente se puede no cumplir la predicción realizada con respecto a uno de los genes que codifica un receptor y que indica que dicho paciente responderá correctamente a las dosis normales del fármaco y cumplirse la predicción realizada con respecto a un CYP gen implicado en la eliminación de dicho medicamento, según la cual el paciente presenta un metabolismo ultrarrápido y por ello no puede responder correctamente a las dosis habituales. Hay que tener en cuenta que para que el fármaco realice su acción debe llegar a su diana terapéutica en su forma activa. Así pues hay que contemplar las predicciones farmacogenéticas desde un punto de vista farmacológico y como un todo global. Así, se ha elaborado un algoritmo o tabla de predicciones globales con el fin de dar coherencia a los resultados individuales obtenidos mediante el genotipado (*Figura 27*).

Por otro lado existen importantes factores imponderables que pueden afectar a la actividad de un enzima, que pueden ser individuales (hábitos alimenticios, cotratamientos que no se hayan tenido en cuenta, etc.) o propias de la población (hábitos culturales).

Otro punto importante que puede llevar a discrepancias entre los estudios y la realidad clínica es que es muy posible que algunos marcadores (fundamentalmente marcadores sinónimos que puedan estar en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo funcional) tengan un marcado carácter poblacional y que estén ligados a la respuesta en ciertas poblaciones y no en otras.

Hay que tener en cuenta que es muy posible que para alguno de los medicamentos existan vías alternativas de metabolización. Estas vías pueden ser menos efectivas en condiciones normales, pero es posible que ante la presencia de factores estimulantes, estas puedan reemplazar a las principales en el caso de que se encuentren desactivadas genéticamente. Así, aunque la genética indique que el paciente puede presentar efectos secundarios debido a que el mecanismo principal de eliminación del fármaco es defectivo, éste puede presentar una respuesta normal, debido a la sobreactivación de dicha ruta secundaria.

En muchos casos la potencia estadística de los estudios en los que se han basado las predicciones es baja, debido fundamentalmente a las bajas frecuencias de los

genotipos en cuestión. Por ello es común que las predicciones se hayan hecho con respecto a la presencia de los alelos en Homocigosis, lo cual incrementa la potencia de la predicción en cuanto a fiabilidad, pero la disminuye en cuanto a efectividad.

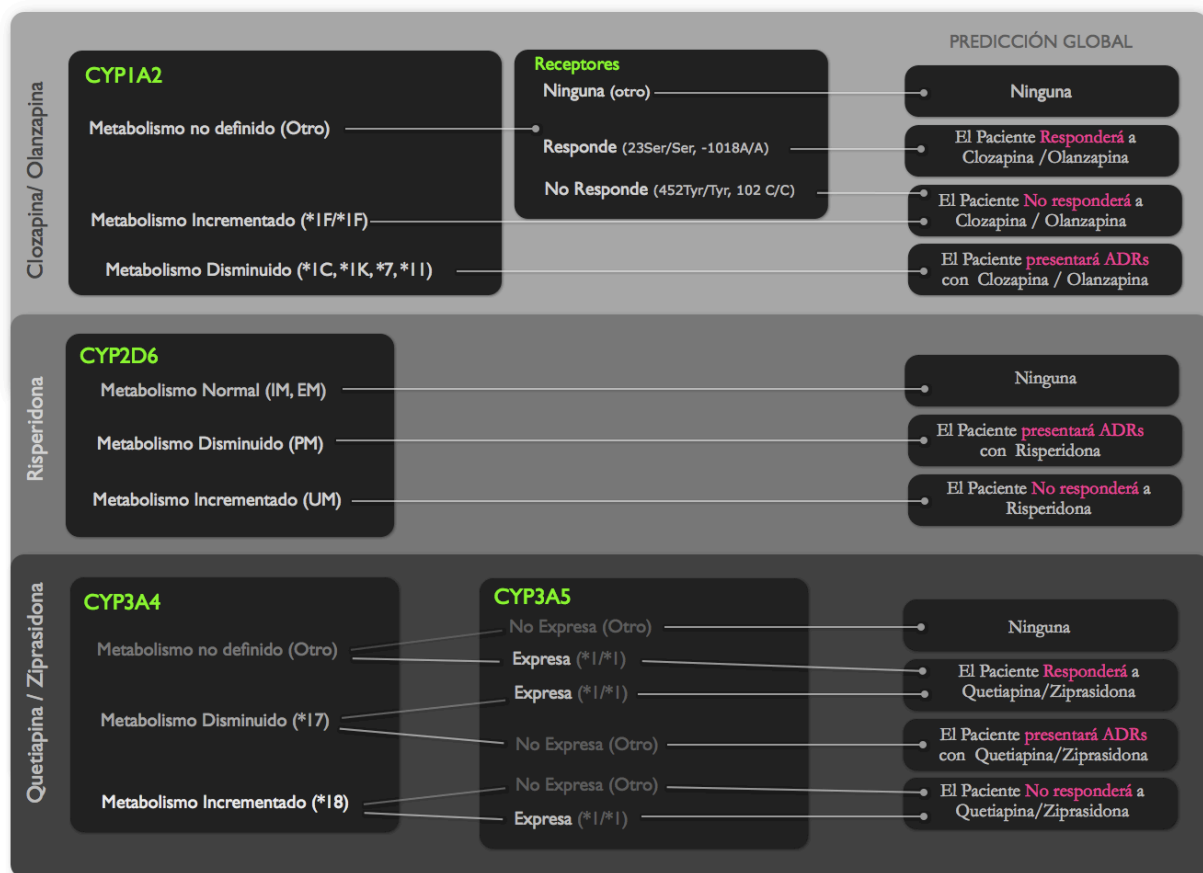


Figura 27 : Tabla de predicciones Globales. Se realiza una predicción única para cada paciente y cada medicamento. La predicción global para un medicamento dado se define por el genotipo de uno o más genes implicados en su respuesta.

### 3. APLICACIÓN DEL PROGRAMA

#### 3.1 APLICACIÓN EN EL ESTUDIO PILOTO DE FARMACOGENÉTICA DE ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS EN PACIENTES DEL ÁREA SANITARIA DE OURENSE

##### 3.1.1 Fundamentos del estudio.

El “Estudio Piloto de Farmacogenética de Antipsicóticos en pacientes del área sanitaria de Ourense” se inició con la creación de un grupo de colaboración en el que un grupo integrado por facultativos del Servicio de Psiquiatría del Complejo Hos-

pitalario de Ourense fue el encargado de la parte clínica (reclutamiento de pacientes, análisis de sus historias clínicas y la evaluación de su respuesta y efectos secundarios, etc.), mientras que la parte molecular correspondió a la Unidad de Medicina Molecular (elección de marcadores genéticos, elección y desarrollo de los métodos de genotipado, etc.). El grupo de psiquiatría se encargó de la extracción de sangre total, que era enviada semanalmente a la unidad dónde se realizaba la extracción de DNA y el genotipado pertinente.

Los integrantes del Servicio de Psiquiatría del Complejo Hospitalario de Ourense fueron : Alcira Cibera, Fernanda Iglesias, Estefanía Pumar, D. Simón y G. Gómez.

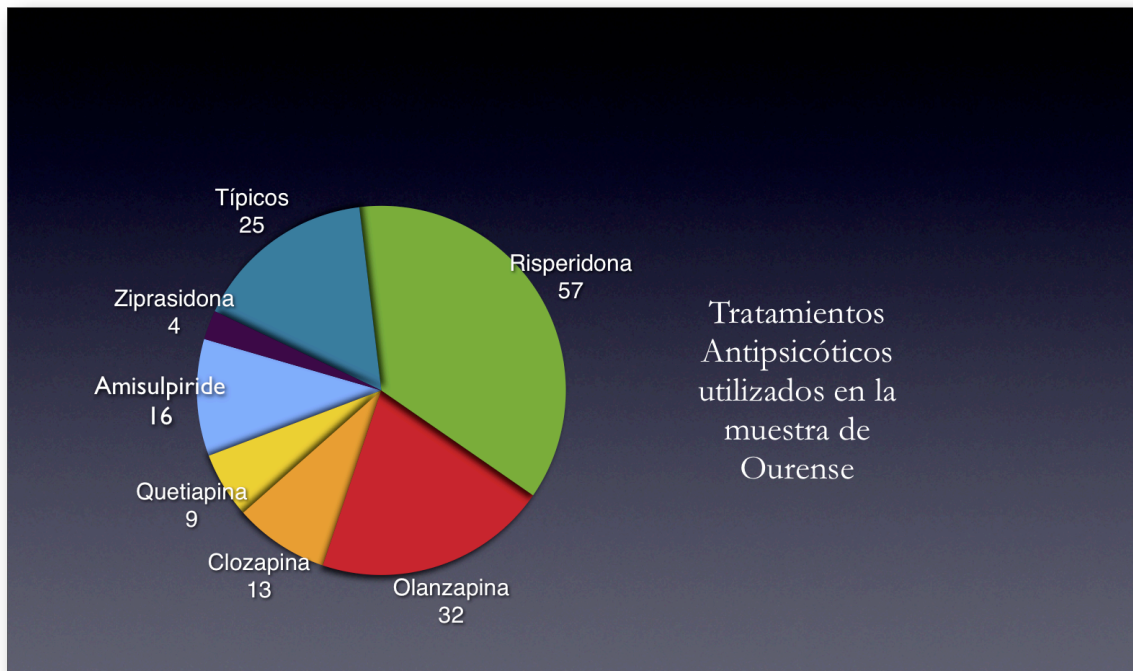


Figura 28: Representación gráfica del número de pacientes por tratamiento antipsicótico utilizado en la muestra de Ourense

La propuesta inicial planteada por el grupo de psiquiatría significaba un intento de encontrar asociaciones entre los fenotipos predictivos obtenidos de un análisis de CYP2D6 y el estatus de respondedor / no respondedor en 160 pacientes, **diagnosticados de esquizofrenia mediante los criterios DSM-IV**, en el área sanitaria de Ourense. De estos 160 pacientes 100 habían sido clasificados como respondedores al tratamiento con antipsicóticos y 60 como no respondedores, siguiendo los criterios de respuesta DSM-IV y con sus síntomas medidos mediante la escala PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale* (Kay, Fiszbein y Opler, 1987)). La idea era simple: realizar el genotipado de los 160 pacientes y comprobar si los genotipos

relacionados con falta de respuesta se encontraban con mayor frecuencia en los 60 no respondedores de forma estadísticamente significativa. A la hora de plantearse un programa de farmacogenética, este estudio resulto de gran ayuda al permitirnos profundizar en una serie de problemas conceptuales de enorme relevancia a la hora de una futura aplicación del mismo en la práctica clínica:

**Concepto de Respuesta:** pese a que el concepto de respuesta terapéutica al tratamiento está bien establecido a nivel clínico, no es un concepto útil para un análisis farmacogenético basado en un único gen (*CYP2D6*). Hay que tener en cuenta que *CYP2D6* no metaboliza todos los fármacos antipsicóticos con los que puede ser tratado un paciente, con lo que el genotipado de éste gen resultará inútil en aquellos pacientes que no hayan sido tratados con un fármaco ligado a *CYP2D6*.

**Elevado número de Fármacos:** la distribución de tratamientos en los pacientes del estudio es un fiel reflejo de la enorme variabilidad que podemos encontrar en la práctica psiquiátrica diaria. Esto dificulta enormemente un estudio basado en asociación, ya que al tener que subdividir la muestra por medicamentos se disminuye enormemente la potencia estadística del estudio. Encontramos un total de 13 medicamentos distintos, muchos de ellos dispensados de forma concomitante: Amisulpiride, Clotiapina, Clozapina, Decanoato de Flufenacina, Haloperidol, Olanzapina, Perfenacina, Pimozide, Quetiapina, Risperidona, Ziprasidona y Zuclopentixol (*ver Figura 28*)

**Falta de potencia del marcador:** se sabe que, si bien aquellos individuos clasificados como Metabolizadores Ultrarrápidos (UMs) para *CYP2D6* son mayoritariamente no respondedores para los fármacos metabolizados por éste gen, no todos los no respondedores son UMs. La frecuencia de UMs (un 1-7% en caucasoides y hasta un 25% en africanos) es mucho menor que la de no respondedores al tratamiento antipsicótico que se estima en un 25-30%. Teniendo en cuenta que la muestra es más o menos representativa de las frecuencias de respuesta estimadas (quizá algo mayor, con un 37,5% de no respondedores), es casi imposible pensar que el análisis de *CYP2D6* explique el total de faltas de respuesta.

Efectos Psíquicos	Efectos neurológicos	Efectos autonómicos	Otros efectos
Dificultad de concentración Astenia/lasitud/fatigabilidad Somnolencia/sedación Alteraciones mnésicas Depresión Tensión/inquietud Aumento de la duración sueño Disminución de la duración sueño Aumento de los sueños Indiferencia emocional	Distonía Rigidez Hipocinesia/acinesia Hipercinesia Temblor Acatisia Convulsiones epilépticas Parestesias	Trastornos de acomodación Aumento de la salivación Disminución de la salivación Náusea/vómito Diarrea Estreñimiento Alteraciones de la micción Poliuria/polidipsia Vértigo ortostático Palpitaciones/taquicardia Aumento de la sudoración	Exantema morbiliforme Exantema petequeial Exantema urticarial Exantema psoriásico Exantema inclasificable Prurito Fotosensibilidad Aumento de la pigmentación Aumento de peso Pérdida de peso Menorragia Amenorrea Galactorrea Ginecomastia Aumento del deseo sexual Disminución del deseo sexual Disfunción eréctil Disfunción eyaculatoria Disfunción orgásmica Disfunción de la lubricación vaginal Cefalea tensional Cefalea migrañosa Cefalea (otras formas) Dependencia física Dependencia psíquica

Tabla 35: Efectos secundarios relacionados con el tratamiento antipsicótico, incluidos en la escala UKU.

Así parecía evidente la necesidad de genotipar otros genes a parte de *CYP2D6* que nos permitiesen predecir la respuesta a otros antipsicóticos diferentes a la Risperidona. Así se eligieron nuevos genes del complejo Citocromo P450 como responsables del metabolismo de varios antipsicóticos de los utilizados en la muestra de estudio: *CYP1A2*, que metaboliza la Olanzapina y la Clozapina y *CYP3A4-CYP3A5*, encargados del metabolismo de Quetiapina y Ziprasidona. Además se

añadieron al panel los genes de los receptores de Serotonina *5-HT2A* y *5-HT2C* y de Histamina *H2*.

Por otro lado la objetivo inicial de asociar el genotipo únicamente con el estatus de respondedor y no respondedor se reveló insuficiente, ya que la bibliografía indicaba que el estudio farmacogenético de estos genes era realmente interesante para explicar la aparición de efectos secundarios adversos en los pacientes. Así se procedió a la recolección de datos sobre los efectos secundarios.

Como medida de los efectos secundarios se utilizó la escala conocida como UKU (*Udvalg für Kliniske Undersøgelser*), basada en una clasificación de los efectos adversos en cuatro clases tipos: Efectos Psíquicos, Neurológicos, Autónomos y Otros (*Ver Tabla 35*). A cada efecto se le atribuye un valor numérico del 1 al 4 según su gravedad. Con esta escala se obtiene un índice UKU general que, sin embargo, no resultó muy útil para el estudio, ya que los 160 pacientes presentaban efectos secundarios teniendo en cuenta este dato. Así se realizó una división en UKUs parciales atendiendo a la clasificación de los efectos secundarios anteriormente descrita. Hay que tener en cuenta que existen efectos secundarios graves que se han venido relacionando con los tratamientos con antipsicóticos, fundamentalmente trastornos del movimiento (“parkinsonianos”), incremento de peso etc., que presentan mayor relevancia para el estudio que otros

### 3.1.2 Genotipado: Métodos de utilizados y resultados.

Este estudio se aprovechó para desarrollar un panel de genes y polimorfismos adecuado a la farmacogenética de los antipsicóticos atípicos y las técnicas de genotipado necesarias. La idea final era disponer de una entidad compacta de genotipado rápida, escalable, robusta y coste-efectiva para ser aplicada inicialmente en este estudio piloto, pero con vistas a su utilización como una prueba clínica más. Así, aunque inicialmente se plantearon técnicas diferentes para los diferentes genes (por una parte CYP2D6 y por otra el resto), se terminó adoptando una técnica común para todas las variables tipadas de todos los genes.

Pese a que se realizó genotipado por secuenciación directa para el gen CYP1A2, el genotipado de 165 muestras fue repetido mediante SNaPshot® con el fin de crear una entidad compacta de genotipado. Los genotipos realizados mediante ésta técnica tuvieron una concordancia completa con los obtenidos anteriormente. Para CYP2D6 se utilizó el Amplichip P450, aunque previamente se habían realizado los

genotipos de unas 20 variables mediante secuenciación directa. Los genotipos obtenidos mediante la técnica de Roche presentaron una concordancia total con los resultados previos.

Finalmente, 28 de las muestras de este estudio fueron genotipadas como controles para poner a punto el sistema basado en Sequenom®: 2 pobres metabolizadores (uno de ellos con uno de sus alelos delecionado), 5 metabolizadores ultrarrápidos, 15 metabolizadores intermedios-extensivos, 1 muestra que había fallado en el Amplichip (no Call) y 5 muestras que no habían sido genotipadas anteriormente por haber sido eliminadas debido a las condiciones de la muestra. La concordancia con los genotipos obtenidos mediante el Amplichip P450 y la técnica de SNaPshot® fue total, pero resultó ser más eficaz permitiendo el genotipado de dos muestras que no habían podido ser genotipadas usando la tecnología de Roche.

#### a) RESULTADOS AMPLICHIP P450:

De las muestras a procesar, 159, únicamente se obtuvieron genotipos para 133 muestras: 7 muestras fueron eliminadas debido a un ratio de absorbancia 260 /280 por debajo o por encima del intervalo exigido por la técnica, 1 de las muestras falló en el chequeo de la PCR-A y 3 fallaron en el genotipado de alguno de los SNPs del chip, provocando un “No Call”, fundamentalmente debido a un fallo en el SNP 1846 G-A. 15 muestras no fueron genotipadas por causas ajenas a la técnica. Eliminando aquellas que no fallaron debido al método, el porcentaje de fallos (“No Calls”) es de un 2,9%, dejando un porcentaje de éxito del 97,9%. No se incluyen en esta proporción aquellas muestras eliminadas debido a las exigencias de pureza de la muestra. De las muestras genotipadas encontramos un porcentaje de un 10,5% de pacientes que poseen un genotipo diferente al común y por tanto se les puede efectuar algún tipo de predicción respecto a CYP2D6. La frecuencia de Pobres Metabolizadores en la población estudiada fue de un 6,77%, mientras que la de Metabolizadores Ultrarrápidos fue del 3,76%.

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo más común es el alelo salvaje \*1, que representa el 37,59% de todos los alelos, seguido del \*2 con un 16,92%, el \*4 con un 16,17% y el \*41 con un 9,40%. La frecuencia de duplicaciones alélicas en la muestra fue de 3,56%, mientras que el alelo delecionado \*5 representa un 1,13% del total.

Frecuencias Alélicas de CYP2D6

Alelo	Nº	Porcentaje
*1	100	37,59
*1xN	3	1,13
*2	45	16,92
*2xN	6	2,26
*3	10	3,76
*4	43	16,17
*5	3	1,13
*6	5	1,88
*9	10	3,76
*10	5	1,88
*17	2	0,75
*35	9	3,38
*41	25	9,40
Total	266	100,00

Tabla 36: Frecuencias de los alelos de CYP2D6 encontradas en la muestra de pacientes del área sanitaria de Ourense.

Fenotipos predictivos de CYP2D6	Número de Pacientes	Porcentaje del Total	Porcentaje de Genotipos
EMs	102	64,15	76,69%
IMs	17	10,69	12,78%
PMs	9	5,66	6,77%
UMs	5	3,14	3,76%
No Calls	3	1,89	
No se hicieron (otras causas)	15	9,43	
Eliminado Ratio elevado 260/280	6	3,77	
Eliminado Ratio Reducido 260/280	1	0,63	
PCR A Negativa	1	0,63	
Total.....	159		

Tabla 37: Estadísticas de los genotipos de CYP2D6 agrupados según sus fenotipos predictivos.

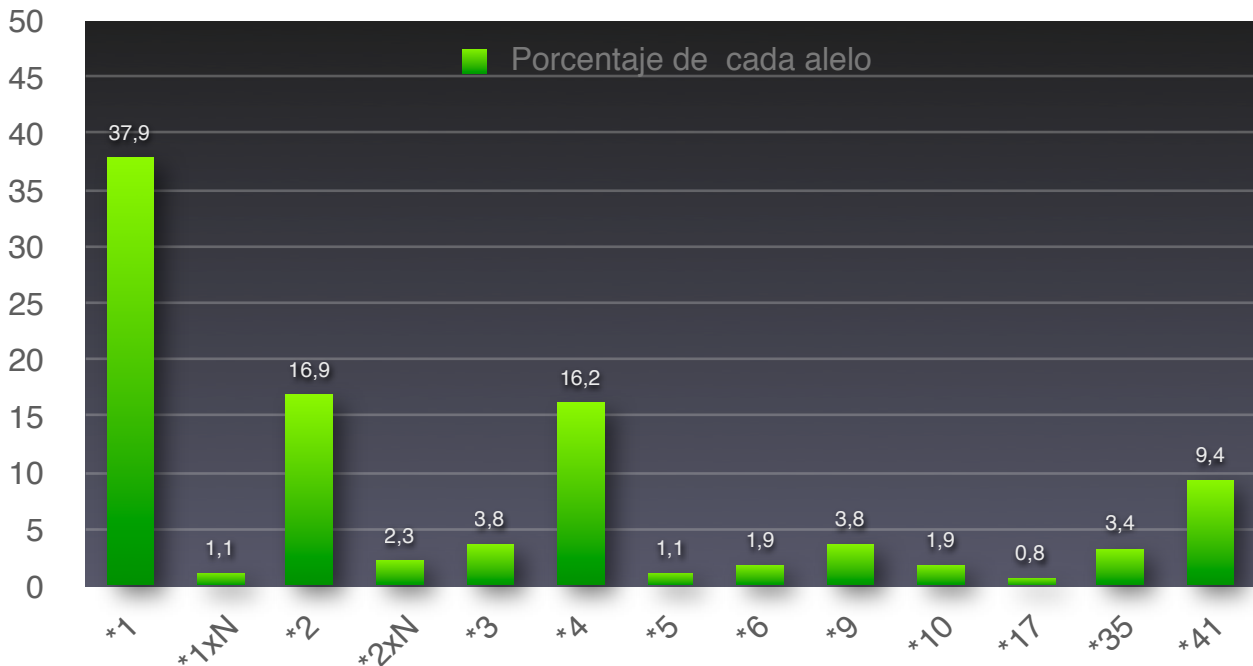


Figura 29: Representación gráfica de las frecuencias alélicas de CYP2D6.

Hay que tener en cuenta que estas frecuencias o son representativas de la población gallega, ya que se trata de una muestra de pacientes escogidos en función de su respuesta a antipsicóticos. Sería conveniente realizar un estudio poblacional para obtener datos fiables de frecuencias alélicas y de la prevalencia de los genotipos PM y UM en esta población.

#### b) RESULTADOS SNaPshot®:

Se propuso genotipar 165 muestras procedentes del estudio de Ourense (6 más para el Amplichip debido a que el genotipado por este método se realizó posteriormente en el tiempo, con lo que se pudo acceder a un mayor número de muestras) como complemento al genotipado de CYP2D6, con el fin de incrementar el número de fármacos con respecto a los cuales se pudiese ofrecer información farmacogenética. Así, el método principalmente utilizado fue SNaPshot®, aunque algunos genes, como CYP1A2 o CYP3A4-3A5 habían sido previamente genotipados por secuenciación directa. Con este método se tiparon 15 SNPs por muestra (*Ver Materiales y Métodos*). De los 2475 genotipos a realizar 2441 fueron realizados con éxito (un 98,62%). Los resultados fueron contrastados con los obtenidos mediante secuenciación. Además se secuenciaron 15 muestras por cada SNP con el fin de validar el método utilizado.

GEN	Homocigotos		Heterocigotos	Total
1A2 3534 (G>A)	162 G/G			162
1A2 -739 (T>G)	157 T/T		4 G/T	161
1A2 -3860 (G>A)	152 C/C		11 C/T	161
1A2 -729 (C>T)	164 C/C			164
1A2 -163 (C>A)	16 C/C	72 A/A	74 C/A	162
1A2 -558 (C>A)	165 G/G			165
3A4 F189S (T>C)	160 T/T			160
3A4 -392 (A>G)	150 A/A	1 G/G	13 G/A	164
3A4 L293P (T>C)	165 T/T			165
3A5 -14690 (G>A)	160 G/G	1 A/A	2 G/A	163
3A5 -6986 (A>G)	135 G/G	4 A/A	23 G/A	162
5HT2A 102 (T>C)	52 C/C	45 T/T	66 C/T	163
5HT2A His452Tyr (C>T)	138 C/C	1 T/T	22 C/T	161
5HT2C Cys23Ser (G>C)	130 G/G	24 C/C	10 C/G	164
H2 -1018 (G>A)	143 G/G	1 A/A	20 G/A	164

Tabla 38: Resultados del Genotipado mediante SNaPshot® de las muestras, Alelos y Genotipos.

b.1) *CYP1A2*.

El genotipado de las 6 variantes polimórficas propuestas para *CYP1A2* (ver *Materiales y Métodos*) permitieron determinar con éxito los alelos de 159 pacientes. En ellos, el 44% aproximadamente de todos los genotipos correspondió a homocigotos para el alelo \*1F, mientras que no apareció ningún homocigoto para el resto de los alelos de interés: \*1C, \*1K, \*7 o \*11, con lo cual se pudo realizar una predicción con respecto a *CYP1A2* a un 44% de los pacientes, suponiendo que sean fumadores (este genotipo se relaciona con una mayor inductibilidad enzimática al tabaco).

<i>CYP1A2</i>	Número de Pacientes	Porcentaje del Total
*1F/*1F	71	43,83%
*1F/*1	67	41,36%
*1F/*1J	1	0,62%
*1F/*1C	4	2,47%
*1/*1	16	9,88%
?	3	1,85%
Total.....	162	100%

Tabla 39: Combinaciones alélicas del gen *CYP1A2* encontradas en los pacientes del área sanitaria de Ourense. “?” indica que el genotipo es diferente a los anteriores y no puede determinarse.

b.2) *CYP3A4-CYP3A5*:

Con respecto al genotipado de *CYP3A4*, los resultados obtenidos indican que en la población estudiada no existe ningún individuo con los alelos de interés \*17 y \*18, aunque si ha aparecido 1 con el alelo \*1B en homocigosis y 13 con este alelo en heterocigosis. La implicación de esta variante alélica, también denominada *CYP3A4-V* sobre la actividad del enzima o sobre su expresión es aún incierta (Westlind et al., 1999). Los SNPs utilizados no permiten determinar a ciencia cierta que el hecho de no poseer estos alelos indique la presencia del alelo salvaje \*1 y aunque este suele ser determinado como el alelo resultante de la ausencia de cualquiera de los polimorfismos tipados, debido a la existencia creciente de bibliografía que indica una mayor diversidad de combinaciones haplotípicas (como los alelos \*8, \*11, \*12, \*13, \*16<sup>a</sup>, 16B o \*20) con efecto sobre la actividad del enzima, no podemos asegurar el genotipado de este alelo como tal.

Sin embargo, en lo que a *CYP3A5* se refiere si encontramos dos individuos con el alelo \*1 en homocigosis y serían estos pacientes los únicos que se podrían beneficiar de una predicción con respecto a este gen. La frecuencia del genotipo \*1/\*1, de un 1,25%, es ligeramente inferior a la esperada según los estudios realizados en población española (Gervasini et al., 2005), estimada en un 2,8%, sin embargo en este caso no se trata de una muestra de individuos al azar sino de pacientes escogidos según su respuesta a los antipsicóticos y otras características clínicas, con lo cual no es una población representativa, y los datos de frecuencias obtenidos no tienen validez desde el punto de vista de un estudio poblacional. Debido a que la existencia de combinaciones haplotípicas distintas a las estudiadas es bastante improbable (existen 11 alelos descritos hasta la fecha), parecen suficientes las posiciones polimórficas genotipadas para la determinación del alelo \*1, sin embargo no se puede descartar que la presencia de algún SNP no tipado implique que no se trate del alelo salvaje sino de un alelo mutante.

<b>CYP3A5:</b>	Número de Pacientes	Porcentaje del Total
*3/*3 (*3 =6986 A>G)	135	85,44
*3/ otro	23	14,56
*6/otro (*6 =14690 G>A)	ninguno	0
*1/*1	2	1,25
Total	160	100,00
<b>CYP3A4</b>	Número de Pacientes	Porcentaje del Total
*17(F189S, 556 T>C)	ninguno	
*18A (L293P, 878 T>C)	ninguno	
*1B/*1B	1	0,61
*1B/ otro	13	7,92
Otros	150	93,75
Total	164	

Tabla 40: Combinaciones alélicas de los genes CYP3A4 y CYP3A5 encontradas en los pacientes del área sanitaria de Ourense.

### b.3) H2:

Sólo uno de los pacientes analizado poseía en homocigosis la variante A del polimorfismo del promotor H2 -1018 G/A (ver *Tabla 36*). Así este polimorfismo sólo sería informativo para un 0,6% de la población estudiada. Esta baja frecuencia encaja con las frecuencias descritas con anterioridad (Mancama et al., 2002), pese a que la muestra no debe ser tomada como poblacionalmente representativa.

### b.4) 5HT2A (*HTR2A*):

Con respecto al SNP 102 T/C, 52 pacientes presentan el alelo C en Homocigosis, mientras que el SNP 452Tyr se encontraría en Homocigosis en un solo paciente (ver *Tabla 36*). Según estos datos 102 T/C sería informativo para el 31,9% de los pacientes estudiados e His452Tyr lo sería para el 0,62%. Estos datos no deben extrapolarse a la población general.

### b.5) 5HT2C (*HTR2C*):

Un total de 24 pacientes mostraron el alelo Ser del SNP no sinónimo cys23ser en Homocigosis (ver *Tabla 36*) lo cual indica que se pudo realizar una predicción a un 14,63 % de la muestra estudiada. Esta estimación, como hemos indicado anteriormente, no es una estimación poblacional.

### c) RESULTADOS DE SEQUENOM®

Los resultados para las 18 muestras de este estudio analizadas mediante Sequenom® tuvieron un 99,9% de concordancia con las obtenidas mediante métodos anteriores (SNaPshot® y Amplichip P450).

#### 3.1.3 Aplicación de la tabla de predicciones en la muestra del estudio

Con esta información se aplicaron las predicciones realizadas partiendo del estado de conocimiento actual y se analizó de forma retrospectiva la utilidad de dichas predicciones en las muestras analizadas. Siendo un estudio retrospectivo no nos hizo falta esperar a ver si estas predicciones se cumplen, ya que dispusimos de los todos los datos clínicos de respuesta y efectos secundarios, con lo cual pudimos realizar esa predicción y determinar si se habría cumplido en el momento del tratamiento. Así pues se elaboró un listado de muestras a las cuales se les pudieron realizar predicciones (es decir, muestras que poseían alguno de los genotipos relacionados con la respuesta al fármaco), acompañado por la predicción en concreto.

El grupo de psiquiatría de Ourense analizó muestra por muestra cada una de las predicciones emitidas y comprobó, mediante el análisis de la historia clínica y los datos recogidos, tanto de forma previa como de forma paralela al genotipado, si dicha predicción era aplicable al paciente: fundamentalmente si este paciente había sido tratado con el/los medicamentos para los cuales se emitía la predicción o bien si cumplía con los criterios de inclusión en dicha predicción (en el caso de las predicciones respecto al alelo \*1F de CYP1A2, la predicción está supeditada al estatus de fumador del paciente). Evidentemente, muchas de las predicciones no fueron aplicables por estos motivos. Finalmente se comprobó si las predicciones realizadas se cumplían de forma retrospectiva, es decir, si en el momento en el que el paciente fue tratado con el fármaco en cuestión, la respuesta al mismo fue equivalente a la predicha. Así se elaboró una tabla de aciertos y fallos con respecto a la predicción (ver *Tablas 41-42*).

En el caso de las predicciones realizadas a un mismo paciente para varios SNPs (ver *Tabla 41*) hay que tener en cuenta que la acción de los citocromos es anterior a la unión del antipsicótico en el receptor. En 5 de las muestras de esta tabla no se cumplen todas las predicciones individuales, pero se cumplen al menos una de ellas. En estos casos hay que tener en cuenta que, si las predicciones se refieren a

dos receptores y una indica que el paciente responderá y otra que no lo hará, primará la positiva, ya que si el antipsicótico puede actuar sobre ambos, aunque uno no se exprese o tenga su función interrumpida, el otro seguirá activo. En el caso de que se espere un incremento de actividad de la enzima metabolizadora del fármaco y la predicción contradiga la correspondiente a algún receptor, deberá tener en cuenta que el fármaco se degradará con mayor rapidez, lo cual impide o dificulta que el principio activo llegue a su receptor diana y cumpla su función.

Muestra	SNP / predicción	¿Cumple la predicción?
E168	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde bien a Olanzapina-Clozapina	no
E168	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E168	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde bien a Olanzapina-Clozapina	no
E175	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde bien a Olanzapina-Clozapina	no
E175	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E347	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde bien a Olanzapina-Clozapina	no
E347	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E422	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E422	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E434	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	si
E434	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
E434	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E557	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	si
E557	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
E654	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E654	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E655	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E655	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E706	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	si
E706	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E757	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E757	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
F276	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	no
F276	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
F47	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
F47	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E554	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	si
E554	CYP2D6 (PM) / Presentarán efectos secundarios con Risperidona	si
E497	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E497	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E655	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E655	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E199	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E199	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si

Tabla 41: Resultados de las predicciones en pacientes a los que se le ha realizado predicciones parciales con respecto a varios genes.

Muestra	SNP / predicción	¿Cumple la predicción?
E200	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	no
E313	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
E610	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
F184	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
F316	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	no
D352	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E133	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E169	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E171	3A5 (-6986 G>A) / Responde mal a Quetiapina-Ziprasidona	si
E173	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E174	3A5 (-6986 G>A) / Responde mal a Quetiapina-Ziprasidona	si
E308	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E312	CYP2D6 (PM) / Presentarán efectos secundarios con Risperidona	si
E314	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E348	CYP2D6 (PM) / Presentarán efectos secundarios con Risperidona	si
E349	5HT2C-(Cys23Ser G>C) / responde mejor a Olanzapina-Clozapina	si
E350	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E437	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E439	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E491	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E553	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E658	CYP2D6 (PM) / Presentarán efectos secundarios con Risperidona	si
E659	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E708	1A2 (-163 C>A) Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E901	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E950	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
E951	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
F185	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si
F275	5HT2A (-102 C>T) / Responde mal a Olanzapina-Clozapina	si

Tabla 42: Resultados de las predicciones en pacientes a los que se le ha realizado predicciones parciales con respecto a un solo gen.

Con predicción para 1 gen	Muestras	%
Aciertos	24	82,76
Fallos	5	17,24
Total	29	100,00

Con predicciones para varios genes	Muestras	%
Cumplen Todas	10	62,5
No cumplen ninguna	0	0,00
Cumplen al menos 1	6	37,5
Total	16	100,00

Muestras con predicción:	74
Predicción no Aplicable	28
Predicción Aplicable	46

Total Global predicciones aplicadas	Muestras	%
Aciertos:	40	88,88
Fallos:	5	11,11
Total:	45	100,00

Total de muestras del estudio	Muestras	%
Muestras a las que se les ha podido realizar una predicción	112	67,87
Muestras a las que no se les ha podido realizar ninguna predicción	53	32,12
Total	165*	100

Tabla 45: Resumen de los resultados de las predicciones en pacientes.

Las 165 muestras totales no se pudieron tipar para todos los SNPs, debido a falta de muestra.

Aplicando las predicciones de forma individual, gen a gen, observamos un número de fallos superior al esperado ya que muchas de las predicciones no se cumplen de forma individual. Este aspecto ya se había supuesto a la hora de realizar un sistema de predicciones útil: el análisis de las variables propuestas por separado no es de utilidad si lo que pretendemos es dotar de utilidad clínica al programa de farmacogenética propuesto; la interpretación de los datos debe realizarse desde un punto de vista global y de una forma secuencial, del mismo modo que los genes estudiados se ven implicados en la acción terapéutica del fármaco.

Es, sin embargo, cuando aplicamos la tabla de predicciones globalmente a cada paciente y para cada fármaco cuando nos son revelados los verdaderos resultados. El número de predicciones acertadas se incrementa cuando tenemos en cuenta tan-

to los genes implicados en el metabolismo como los de las dianas terapéuticas de los antipsicóticos. Podemos distinguir dos grupos de pacientes según el número de predicciones realizadas: a una parte únicamente se les ha podido realizar una predicción con respecto a un único polimorfismo (*Tabla 42*) de un único gen y a otros se les ha podido realizar predicciones de más de un gen (*Tabla 41*). Aunque existen pacientes con varias predicciones parciales de cada gen emitidas que cumplen con todas ellas, como E757 o F47 (ver *Tabla 42*), existen muchos otros que cumplen sólo alguna o algunas de ellas. Tomadas de forma individual estas predicciones fallidas tendrían mucha relevancia como resultado, sin embargo al tener en cuenta todas las predicciones emitidas para cada paciente, observamos que todos los pacientes a los que se les han realizado varias predicciones presentan, al menos, un acierto (ver *Tabla 43*). Es más: si observamos con detenimiento los aciertos y los fallos parciales nos damos cuenta de que estos tienen un significado biológico: si se cumple la predicción emitida para el gen CYP1A2 y su alelo \*1F, deberemos entender que, según dicha predicción, su metabolismo está acelerado, con lo cual, la predicción de que el individuo debe responder bien al tratamiento derivada del genotipo de alguno de los receptores no tendrá validez, y el fallo de dicha predicción no deberá tenerse en cuenta: no puede llegar cantidad suficiente de principio activo al receptor, ya que el fármaco es degradado rápidamente. En el caso de que existan predicciones contradictorias con respecto a dos receptores habrá que estudiar el caso de forma individual con respecto al fármaco utilizado: es posible que el fármaco en cuestión presente una especial afinidad por uno de ellos o que pueda utilizar de forma indistinta ambos.

Así parece que la utilidad del programa de Farmacogenética aquí presentado se confirmaría con el alto número de aciertos (88,88%) frente a fallos (11,11%) resultado de la aplicación a una muestra real de pacientes. Por otro lado el porcentaje de pacientes a los cuales se les ha podido realizar una predicción asciende al 67,87%. Como se puede ver la capacidad predictiva del genotipado de CYP2D6 propuesto en un inicio se ve muy incrementada con la adición de más genes al panel de genotipado.

El siguiente paso para confirmar estos resultados como etapa previa a la implantación de este tipo de programas en el día a día clínico sería su uso en estudios piloto prospectivos a doble ciego, estudios dónde se tuviese en cuenta esta predicción y se llevase a cabo una intervención terapéutica bien como cambio de fármaco bien como cambio de dosis.

## 3.2 APLICACIÓN DEL PROGRAMA AL PROYECTO "ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIPSICÓTICOS EN ESQUIZOFRÉNICOS DEL SUR DE BRASIL"

### 3.2.1 Fundamentos del Estudio

El objetivo de este proyecto es verificar la influencia de polimorfismos en genes codificantes de enzimas metabolizadores y de receptores diana de fármacos en la respuesta al tratamiento con antipsicóticos típicos y atípicos, en una muestra de pacientes esquizofrénicos del sur de Brasil. El objetivo específico del genotipado realizado es la validación de frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs que definen alelos del gen CYP2D6, en tres grupos de población brasileña: pacientes esquizofrénicos con tratamiento antipsicótico, individuos sanos euro-descendientes e individuos sanos afro-descendientes, con el uso de las técnicas de secuenciación, SNaPshot® y Sequenom®. Además, esos datos serán utilizados para un análisis de asociación entre esos polimorfismos y la respuesta a la medicación antipsicótica y ocurrencia de reacciones adversas en esquizofrénicos de Porto Alegre, en la zona sur de Brasil. Otros SNPs adicionales en genes de enzimas metabolizadores y de receptores de drogas también ya habían sido analizados.

Los integrantes de este proyecto son: Fabiana Barzotti Kohlrausch y Mara H. Hutz (investigadora principal y tutora) y los Médicos Psiquiatras Paulo Belmonte de Abreu, Clarissa Gama, Maria Inês Lobato.

### 3.2.2 Genotipado: Métodos de utilizados y resultados.

Se utilizó fundamentalmente el Genotipado de alta capacidad basado en la plataforma Sequenom®. Los resultados fueron contrastados mediante secuenciación directa y SNaPshot®. Igualmente se utilizaron estos métodos de baja capacidad para el tipado de aquellas muestras que, por su calidad, no pudieron ser correctamente tipadas por el método propuesto.

TABLA DE GENOTIPOS ENSAYO DNA GENÓMICO

Gen/ Polimorfismo	Homozigoto Alelo 1	Homozigoto Alelo 2	Heterozigotos	Fallos
5HT2A His452 Tyr	288 Homozigotos C/C	2 Homozigotos T/T	75 Heterozigotos T/C	
5HT2A 102 T>C	129 Homozigotos C/C	71 Homozigotos T/T	165 Heterozigotos T/C	
5HT2C_CYS23SER	51 Homozigotos C/C	264 Homozigotos G/G	50 Heterozigotos G/C	
H2-1018G-A	2 Homozigotos A/A	320 G/G	43 Homozigotos A/G	
CYP1A2 -739T>G	1 Homozigoto G/G	335 Homozigotos T/T	29 Heterozigotos G/T	
CYP1A2-163C>A	36 Homozigotos C/C	168 A/A	161 Heterozigotos C/A	
CYP1A2 558C>A	365 Homozigotos C/C			
CYP1A2 -729C>T	361 Homozigotos C/C		4 Heterozigotos	
CYP1A2 -3860G>A	11 Homozigotos A/A	268 Homozigotos G/G	86 Heterozigotos A/G	
CYP1A2 3534G>A	365 Homozigotos G/G			
CYP3A4_L373F	365 Homozigotos C/C			
CYP3A4_R130Q	365 Homozigotos G/G			
CYP3A4_P416L	365 Homozigotos C/C			
CYP3A4_L293P	365 Homozigotos T/T			
CYP3A4_1461insA	363 Homozigotos DEL/DEL		2 Heterozigotos DEL/InsA	
CYP3A4-392	276 Homozigotos A/A	14 Homozigotos G/G	75 Heterozigotos G/A	
CYP3A4_T363M	365 Homozigotos C/C			
CYP3A4_F189S	365 Homozigotos T/T			
CYP3A4_T185S	365 Homozigotos C/C			
CYP3A5 6986A>G	235 Homozigotos G/G	27 Homozigotos A/A	103 Heterozigotos A/G	
CYP3A5 14690G>A	354 Homozigotos G/G		11 Heterozigotos G/A	
CYP2C19_681G-A	7 Homozigotos A/A	255 Homozigotos G/G	82 Heterozigotos A/G	21
CYP2C19_636G-A	362 Homozigotos G/G			3

Tabla 44: Genotipos por SNP obtenidos para la muestra del estudio farmacogenético del sur de Brasil.

Alelo	Número	Porcentaje
*1	303	41,74
*2A	130	17,91
*2D	7	0,96
*3	6	0,83
*4A	58	7,99
*4D	13	1,79
*4J	13	1,79
*4K	4	0,55
*4B	1	0,14
*9	11	1,52
*6A	4	0,55
*6C	1	0,14
*10B	18	2,48
*10A	2	0,28
*14B	1	0,14
*15	8	1,10
*17	26	3,58
*19	2	0,28
*29	13	1,79
*35	38	5,23
*40	3	0,41
*41	64	8,82
TOTAL	726	100,00
CYP2D6 Duplicado	42	
CYP2D6 Deleccionado (*5)	7	

Tabla 45: Alelos de CYP2D6 y frecuencias en la muestra del estudio farmacogenético del sur de Brasil.

Los datos relativos al fenotipo predictivo pertenecen a los resultados del estudio para el cual realizamos el genotipado y por ello no están incluidos como resultados de esta tesis. Asimismo, la aplicación de las tablas de predicciones se ha sugerido al equipo de la Dra. Hutz y los resultados de su aplicación pertenecen igualmente a dicho estudio.

El método de Sequenom® elegido para la realización del genotipado en estas muestras se ha mostrado eficiente y rápido (se han tipado las 363 muestras en un tiempo aproximado de dos semanas), si bien la imposibilidad de genotipar algunos

de los SNPs (CYP3A4-392, CYP1A2 -729C>T y CYP1A2 -3860G>A), para los que se realizó un genotipado de baja capacidad por SNaPshot®, debe ser solventada para evitar el uso de múltiples técnicas, lo que ralentiza el análisis y no favorece su optimización. Por otro lado la imposibilidad temporal para la realización de réplicas de todos los ensayos ha conllevado a que la tasa de éxito en el genotipado sea realmente menor de lo que se podría conseguir. Por otro lado se ha comprobado que la calidad y la cantidad de muestra es un factor bastante determinante a la hora de obtener genotipos completos, por ello ha sido imposible realizar el genotipado de 37 de las 400 muestras propuestas inicialmente, debido a su baja concentración o a un volumen insuficiente. Sólo pasaron al estudio aquellas muestras con concentración suficiente en las que se había amplificado correctamente el fragmento de 6237 pares de bases(363).

La realización de este estudio y los problemas surgidos durante su desarrollo han permitido perfeccionar los diseños originales, localizar sus puntos débiles y realizar una estima de si es posible realizar un panel de genotipado farmacogenético dirigido a su uso clínico, en relación a su rapidez, su fiabilidad y su robustez.

Aunque es evidente que en el campo de la Farmacogenética de antipsicóticos el estado de conocimiento no está aún tan desarrollado como para permitir evidencias totales, no es menos cierto que las evidencias existentes no pueden ser pasadas por alto.

Las dificultades relacionadas con la naturaleza de la Esquizofrenia como enfermedad de difícil diagnóstico, numerosos tratamientos y cuya etiología no se conoce al 100%, se ven incrementadas por las cuestiones relacionadas con los estudios farmacogenéticos en general. En muchos casos es imposible, salvo que se cuente con una iniciativa global, conseguir un número suficiente de muestras para hacer frente a polimorfismos con frecuencias muy bajas y la formación de subgrupos muestrales causados por la existencia de diferentes tratamientos. Además existe el problema de la comedición y la enorme cantidad de factores ambientales y po-

blacionales a tener en cuenta, muchos de los cuales pueden ocultar relaciones sólidas genotipo-fenotipo.

En el caso de la Farmacogenética del tratamiento de la esquizofrenia nos encontramos en un momento en el que parece necesario dar uso a lo que ya se conoce para obtener un verdadero conocimiento de ello: los estudios existentes están muy fragmentados y no se realizan sobre muestras reales con los problemas reales. Es imprescindible saber si las evidencias científicas existentes son útiles y pueden aplicarse para dar respuesta a las demandas clínicas. Es imprescindible utilizar lo ya existente para saber si puede o no utilizarse.

Hay que tener en cuenta que ya se dispone de la capacidad tecnológica para analizar miles de variables y obtener información de ello.

Curiosamente en los últimos años se ha producido un descenso notable en el número de estudios farmacogenéticos realizados en este campo, otrora productivo, en favor de otros que parecen, a priori, más sencillos. Es muy probable que mucha de la complejidad existente en la Farmacogenética de antipsicóticos se deba a la falta de estudios naturalistas y programas como el aquí presentado.

Los genes propuestos, no son ni mucho menos, los únicos implicados en la variabilidad de las respuestas a los antipsicóticos atípicos, y el panel presentado está diseñado para ser incrementado con la aparición de nuevas evidencias. Genes como los receptores de Dopamina (D2, D3) o el MDR1 han sido incluidos en el mismo aunque no existan aún evidencias que soporten el planteamiento de predicciones, con el fin de obtener información en estudios futuros que nos permita incluirlos en el programa.

Por otro lado, es evidente la necesidad de realizar estudios poblacionales para obtener frecuencias fiables de la zona dónde se llevará acabo un programa de estas características, ya que no podemos estar seguros ni de la relevancia poblacional de los marcadores propuestos en la literatura (en este estudio se han encontrado varios monomórficos) ni de que la relación de los polimorfismos sinónimos con los causales no varíe entre poblaciones. Hay que tener en cuenta que muchos de ellos son genes con un marcado carácter selectivo, que presentan frecuencias muy diferentes según la población de estudio (como ocurre con CYP2D6).

No debemos perder de vista que, pese a que la adquisición de conocimiento como tal puede resultar interesante, el objetivo final de la Farmacogenética debe ser

encontrarle una utilidad clínica y que todo esfuerzo enfocado a tal fin merece la pena.



## CONCLUSIONES



## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Se han analizado una serie de marcadores para comprobar su potencial eficacia para predecir la respuesta en el tratamiento de la esquizofrenia: CYP1A2 3534 (G>A), CYP1A2 -739 (T>G), CYP1A2 -3860 (G>A), CYP1A2 -729 (C>T), CYP1A2 -163 (C>A), CYP1A2 -558 (C>A), CYP3A4 F189S (T>C), CYP3A4 -392 (A>G), CYP3A4 L293P (T>C), CYP3A5 -14690 (G>A), CYP3A5 -6986 (A>G), 5HT2A 102 (T>C), 5HT2A His452Tyr, 5HT2C Cys23Ser, H2 -1018 (G>A), así como los alelos de CYP2D6 \*1 \*2A \*2B \*2D \*3 \*4A \*4B \*4D \*4J \*4K \*6 \*6C \*7 \*8 \*9 \*10A \*10B \*11 \*12 \*14A \*14B \*15 \*17 \*19 \*20 \*25 \*26 \*29 \*30 \*31 \*35 \*36 \*40 \*41 y duplicaciones / deleciones del gen completo. El conjunto de marcadores ha demostrado tener eficacia para su uso farmacogenético en el tratamiento con antipsicóticos.

Los marcadores de CYP1A2 3534, -729, -558 y de CYP3A4 F189S, L293P han resultado ser monomórficos en la población estudiada procedente Ourense (y a excepción del CYP1A2 -729, también en la población del sur de Brasil). La capacidad informativa de estos marcadores se ve así reducida. Hay que tener en cuenta que las frecuencias obtenidas no son estadísticamente representativas de la población general y por tanto el genotipado de estas variables se recomienda ante la posibilidad de mutaciones.

2. Se han desarrollado dos métodos de genotipado aplicados al análisis de variables implicadas en la respuesta farmacogenética a los antipsicóticos: un método basado en la técnica de SNaPshot®, útil para un número de muestras reducido y un método basado espectrometría de masas por MALDI-TOF (plataforma Sequenom®) con dos tipos de ensayos: partiendo de DNA genómico y partiendo de DNA con el gen CYP2D6 preamplificado, integrando, además, un nuevo sistema desarrollado para la detección de dosis para el gen CYP2D6. Este último método permite el genotipado de los marcadores farmacogenéticos anteriormente citados con seguridad y el análisis de una gran cantidad de muestras en un tiempo que lo hace útil para el establecimiento de un programa "real" de farmacogenética. Ambos métodos han sido contrastados mediante la elaboración de tests paralelos de genotipado.

3. Los resultados obtenidos a partir del genotipado de muestras de pacientes indican que la interpretación de los resultados farmacogenéticos y su traspaso a la

práctica clínica requieren del establecimiento de unas tablas claras y precisas de predicciones farmacogenéticas que resulten una guía para el facultativo. Dichas predicciones deben ser globales y no limitarse a la información obtenida del genotipado de un sólo gen. Con los datos disponibles hasta la fecha de hoy, hemos elaborado una tabla de utilización que, en conjunción con el método de genotipado diseñado, permite la traslación a la clínica de la farmacogenética de los antipsicóticos.

4. La efectividad tanto de los marcadores elegidos como del método de genotipado y de la tabla de predicciones ha sido probada en una población de pacientes esquizofrénicos tratados en el área sanitaria de Ourense habiéndose contrastado el método de genotipado, además, en una población de pacientes del sur de Brasil. Los datos obtenidos indican que es posible la utilización del programa de farmacogenética propuesto en una población de pacientes reales.





## BIBLIOGRAFÍA

## CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Hellman K, Pitarque M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Genetic Polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians Affecting Induction and Expression: Characterization of Novel Haplotypes with Single-Nucleotide Polymorphisms in Intron 1. *Mol Pharmacol*. 2003 Sep; **64**(3): 659-69.

Alberdi J, Castro C, Vázquez C. Esquizofrenia *Guías Clínicas (Fisterra)*. 2005; **5** (28).

Albrecht A, Morena PG, Baumann P, Eap CB: High dose of depot risperidone in a nonresponder schizophrenic patient. *J Clin Psychopharm*. 2004; **24**: 673–674

Allorge D, Chevalier D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Suard F, Baumann P, Eap CB, Broly F. Identification of a novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Sep; **56**(3): 341-4.

Arrang JM. Histamine and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 2007; **78**: 247-87

Arranz MJ, Bolonna AA, Munro J, Curtis CJ, Collier DA, Kerwin RW. The serotonin transporter and clozapine response. *Mol Psychiatry*. 2000a; **5**: 124–125.

Arranz MJ, Collier D, Sodhi M, Ball D, Roberts G, Price J, Sham P, and Kerwin R Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene. *Lancet*. 1995; **346**: 281–282.

Arranz MJ, Collier D, Munro J, Sham P, Kirov G, Sodhi M, Roberts G, Price J, Kerwin RW. Analysis of a structural polymorphism in the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and clinical response to clozapine. *Neurosci Lett*. 1996 Oct 18; **217**(2-3): 177-8

Arranz MJ, Munro J, Birkett J, Bolonna A, Mancama D, Sodhi M, Lesch KP, Meyer JF, Sham P, Collier DA, Murray RM, Kerwin RW. Pharmacogenetic prediction of clozapine response. *Lancet*. 2000b; **355**: 1615–1616.

Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, Kirov G, Collier DA, and Kerwin RW. Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry*. 1998a; **3**: 61–66.

Arranz MJ, Munro J, Sham P, Kirov G, Murray RM, Collier DA, Kerwin RW. Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT<sub>2A</sub> receptors and clozapine response. *Schizophrenia Research*. 1998b; **32**: 93-99

Basile VS, Masellis M, Potkin SG, Kennedy JL. Pharmacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy. *Hum Mol Genet*. 2002 Oct 1; **11**(20): 2517-30. Review

Beedham C, Miceli JJ, Obach RS. Ziprasidone metabolism, aldehyde oxidase, and clinical implications. *J Clin Psychopharmacol*. 2003 Jun; **23**(3): 229-32. Review.

Bergman TK, Bathum L, Brosen K: Duplication of CYP2D6 predicts high clearance of desipramine, but high clearance does not predict duplication of CYP2D6. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001; **57**: 123–127

Bernardo M, Parellada E, Lomena F, Catafau AM, Font M, Gomez JC, Lopez-Carrero C, Gutierrez F, Pavia J, Salamero M. Double-blind olanzapine vs. haloperidol D<sub>2</sub> dopamine receptor blockade in schizophrenic patients: a baseline-endpoint. *Psychiatry Res*. 2001 Aug 25; **107**(2): 87-97.

Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML et al. Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **38**: 471–3.

Bork J, Rogers T, Wedlund P, de Leon J: A pilot study of risperidone metabolism: the role of cytochrome P450 2D6 and 3A. *J Clin Psychiatry*. 1999; **60**: 469–476

Bozikas VP, Papakosta M, Niopas I, Karavatos A, Mirtsou-Fidani V. Smoking impact on CYP1A2 activity in a group of patients with schizophrenia. *Eur Neuro-psychopharmacol*. 2004 Jan; **14**(1): 39-44

Caldwell J. Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of

international significance. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan; **147** Suppl 1:S89-99.

Carlson NR. Fisiología de la conducta. *Ariel Neurociencia*. 1998.

Chou WH, Yan FX, de Leon J, Barnhill J, Rogers T, Cronin M, Pho M, Xiao V, Ryder TB, Liu WW, Teiling C, Wedlund PJ. Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. *J Clin Psychopharmacol*. 2000; **20**: 246-251.

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Ultra-rapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Jul; **274**(1): 516-20

Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Dec; **299**(3): 825-31

De Leon J, Diaz FJ, Rogers T, Browne D, Dinsmore L, Ghosheh O, Dwoskin LP, Crooks P: A pilot study of plasma caffeine concentrations in a US sample of smokers and non-smoker volunteers. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; **27**: 165–171.

De Leon J, Susce MT, Murray-Carmichael E. The AmpliChip CYP450 genotyping test: Integrating a new clinical tool. *Mol Diagn Ther*. 2006; **10**(3):135-51.  
Review

De Leon J, Susce MT, Pan RM, Fairchild M, Koch W, Wedlund PJ: The CYP2D6 poor metabolizer phenotype may be associated with risperidone adverse drug reactions and discontinuation. *J Clin Psychiatry*. 2005; **66**: 15–27

De Leon J. Atypical antipsychotic dosing: the effect of smoking and caffeine. *Psychiatr Serv*. 2004; **55**: 491–493

Dominguez E, Loza MI, Padin F, Gesteira A, Paz E, Paramo M, Brenlla J, Pumar E, Iglesias F, Cibeira A, Castro M, Caruncho H, Carracedo A, Costas J. Extensive linkage disequilibrium mapping at HTR2A and DRD3 for schizophrenia susceptibility genes in the Galician population. *Schizophr Res*. 2007 Feb; **90**(1-3):123-9

Doude van Troostwijk LJ, Koopmans RP, Vermeulen HD, Guchelaar HJ. CYP1A2 activity is an important determinant of clozapine dosage in schizophrenic patients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003; **20**: 451–457

Eap CB, Bender S, Jaquenoud SE, Cucchia G, Jonzier-Perey M, Baumann P, Allorge D, Broly F. Nonresponse to Clozapine and Ultrarapid CYP1A2 Activity: Clinical Data and Analysis of CYP1A2 Gene. *J Clin Psychopharmacol*. 2004; **24**: 214–219.

Eberle-Wang, K., Lucki, I., Chesselet, M.F.,. A role for the subthalamic nucleus in 5-HT<sub>2C</sub>-induced oral dyskinesia. *Neuroscience*. 1996; **72**: 117–128.

Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*. 2006; **57**: 119-37.

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steinke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol*. 1979; **16**: 183-7.

Eierman B, Engel G, Johansson I, Zanger UM, Bertilsson L. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br J Clin Pharmacol* 1997; **44**: 439–46.

Emsley R, Rabinowitz J, Medori R. Time course for antipsychotic treatment response in first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2006 Apr; **163**(4): 743-5.

Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Maier W, Korner J, Bondy B, Chen K, Shih JC, Knapp M, Propping P, Nothen MM. Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia. *Hum Genet.* 1996 May; **97**(5): 614-9.

Evans DA, Manley KA & MCKusik VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br. Med. J.* 1960; **2**:485-491.

Farde L, Nordström AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G: Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine: relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry.* 1992; **49**: 538-544.

Flockhart DA, Rae JM. Cytochrome P450 3A pharmacogenetics: the road that needs traveled. *Pharmacogenomics J.* 2003; **3**(1): 3-5.

Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research Briefing Information for Psychopharmacologic Drugs Advisory Committee Meeting. (2000, July)

Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *Eur J Hum Genet.* 2004 Nov; **12**(11): 916-24.

Garcia-Barcelo M, Chow LY, Lam KL, Chiu HF, Wing YK, Waye MM. Occurrence of CYP2D6 gene duplication in Hong Kong Chinese. *Clin Chem.* 2000 Sep; **46**(9):1411-3.

Garrod AE. The incidence of alcaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet.* 1902; **2**: 1616-1620.

Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007 Jun; **63**(6): 537-46.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*. 1998 Feb; **8**(1): 15-26

Griffith JD, Cavanaugh J, Held J, Oates JA. Dextroamphetamine. Evaluation of psychomimetic properties in man. *Arch Gen Psychiatry*. 1972 Feb; **26**(2): 97-100

Guillermo Gervasini, Sonia Vizcaino, Carolina Gasiba, Juan Antonio Carrillo, Julio Benitez. Differences in CYP3A5\*3 Genotype Distribution and Combinations With Other Polymorphisms Between Spaniards and Other Caucasian Populations. *Ther Drug Monit* 2005; **27**: 819–821

Gunasekara N S & Spencer C M. Quetiapine - a review of its use in schizophrenia. *CNS Drugs* 1998. **9** (4) 325-340

Guzey C, Aamo T, Spigset O: Risperidone metabolism and the impact of being a cytochrome P450 2D6 ultrarapid metabolizer (letter). *J Clin Psychiatry* 2000; **61**: 600–601

Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M. Allele and genotype frequencies of polymorphic DCPI1, CETP, ADRB2, and HTR2A in the Egyptian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002 Apr; **58**(1): 29-36.

Han XM, Ouyang DS, Chen XP, Shu Y, Jiang CH, Tan ZR, Zhou HH. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole *in vivo* related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Nov; **54**(5):540-3

Haro JM, Palacín C, Vilagut GM, Romera B, Codony M, Autonell J. La Epidemiología de los trastornos mentales en España: métodos y participación del estudio ESEMeD-España. *Actas Esp Psiquiatr*. 2003; **31**: 182-91

Harris, E. C. & Barraclough, B. Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis. *British Journal of Psychiatry*. 1997; **170**: 205-228.

Hazelwood LA, Sanders-Bush E. His452Tyr Polymorphism in the Human 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Destabilizes the Signaling Conformation. *Mol Pharmacol*. 2004; **66**: 1293–1300.

Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1; **207**(2 Suppl): 52-6

Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH). Terminology in Pharmacogenomics E15, Current step 2 version. October 2006.

Ishiguro A, Kubota T, Sasaki H, Yamada Y, Iga T. Common mutant alleles of CYP2D6 causing the defect of CYP2D6 enzyme activity in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Apr; **55**(4): 414-5

Jeffrey A. Lieberman, M.D., T. Scott Stroup, M.D., M.P.H., Joseph P. McEvoy, M.D., Marvin S. Swartz, Robert A. Rosenheck, M.D., Diana O. Perkins, M.D., M.P.H., Richard S.E. Keefe, Ph.D., Sonia M. Davis, Clarence E. Davis, Ph.D., Barry D. Lebowitz, Ph.D., Joanne Severe, M.S., and John K. Hsiao, M.D., for the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE). Effectiveness of Antipsychotic Drugs in Patients with Chronic Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005; **353**: 1209-23.

Jeppsen U, Gram LF, Vistisen K, Loft S, Poulsen HE, Brosen K: Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996; **51**: 73–78

Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; **90**(24): 11825-9.

Kalow W. Pharmacogenetics: Heredity and Response to Drugs. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1962.

Kety SS, Rosenthal D, Wender P. Genetic relationships within the schizophrenia spectrum: evidence from adoption studies. In Spitzer RL, Klein DF, (eds), *Critical Issues in Psychiatric Diagnosis*. New York, Raven Press. 1978; 213-223

Kety SS, Rosenthal D, Wender PH, Schulsinger F: Studies based on a total sample of adopted individuals and their relatives: why they were necessary, what they demonstrated and failed to demonstrate. *Schizophr Bull*. 1976; **2**: 413-428

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am. J. Hum. Genet*. 1989; **45**: 889-904,.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataraman R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001 Apr; **27**(4): 383-91.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Nov 18; **54**(10): 1271-94. Review.

Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug; **13**(8): 461-72

Lennard MS, Silas JH, Smith AJ, Tucker GT. Determination of debrisoquine and its 4-hydroxy metabolite in biological fluids by gas chromatography with flame-ionization and nitrogen-selective detection. *J Chromatogr*. 1977; **133**: 161-66.

Libro Blanco sobre el Estudio Socioeconómico sobre el Coste social de los trastornos de salud mental en España. Madrid. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 1998

Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005 Sep 22; **353**(12): 1209-23.

Inayama, Y., Yoneda, H., Sakai, T., Ishida, T., Nonomura, Y., Kono, Y., Takahata, R., Koh, J., Sakai, J., Takai, A., Inada, Y. and Asaba, H., Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia, *Am. J. Med. Genet.* 1996; **67**: 103-105

Lovlie R, Daly AK, Idle JR, Steen VM. Characterization of the 16+9 kb and 30+9 kb CYP2D6 XbaI haplotypes. *Pharmacogenetics*. 1997 Apr; **7**(2):149-52.

Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human *CYP2D6* gene and methods for detection of duplicated *CYP2D6* genes. *Gene*. 1999; **226**: 327–338

Mahgoub A, Idle JR, Dring DG, et al. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*. 1977; **2**: 584-6. Tucker GT, Silas JH, Iyun AO, Lennard MS, Smith AJ. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Lancet*. 1977; **2**: 718.

Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*. 1977; **2**(8038): 584-586.

Malhotra AK, Goldman D, Ozaki N, Breier A, Buchanan R, Pickar D. Lack of association between polymorphisms in the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and antipsychotic response to clozapine. *Am. J. Psychiatry*. 1996; **153**: 1092-1094.

Malhotra AK, Goldman D, Ozaki N, Rooney W, Clifton A, Buchanan RW, Breier A, Pickar D. Clozapine response and the 5HT<sub>2C</sub> Cys23Ser polymorphism. *Neuroreport*. 1996; **2**;7(13): 2100-2.

Mancama D, Arranz MJ, Kerwin RW. Genetic predictors of therapeutic response to clozapine: current status of research. *CNS Drugs*. 2002; **16**(5): 317-24.  
Review

Mancama D, Arranz MJ, Munro J, Osborne S, Makoff A, Collier D, Kerwin R. Investigation of promoter variants of the histamine 1 and 2 receptors in schizophrenia and clozapine response. *Neuroscience Letters* 2002; **333**: 207–11

Masellis M, Basile V, Meltzer HY, Lieberman JA, Sevy S, Macciardi FM, Cola P, Howard A, Badri F, Nothen MM, Kalow W, Kennedy JL. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology*. 1998; **19**: 123–132.

Masellis M, Paterson AD, Badri F, Lieberman JA, Meltzer HY, Cavazzoni P, Kennedy JL. Genetic variation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and response to clozapine. *Lancet*. 1995; **346**: 1108

McElroy S, Sachse C, Brockmoller J, Richmond J, Lira M, Friedman D, Roots I, Silber BM, Milos PM. CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. *AAPS PharmSci*. 2000; **2**(4): E33.

Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*. 2006 Sep-Oct; **24**(5): 381-5.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Estrategia en Salud Mental del Sistema Nacional de Salud. 2006.

Motulsky AG. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA*. 1957; **165**: 835-837

Müller B, Zopf K, Bachofer J, Steimer W. Optimized Strategy for Rapid Cytochrome P450 2D6 Genotyping by Real-Time Long PCR. *Clinical Chemistry*. 2003; **49**(10): 1624 –31.

Murayama N, Soyama A, Saito Y, Nakajima Y, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Kimura H, Goto Y, Saitoh O, Katoh M, Ohnuma T, Kawai M, Sugai K, Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Ozawa S, Sawada J. Six novel nonsynonymous CYP1A2 gene polymorphisms: catalytic activities of the naturally occurring variant enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Jan; **308**(1): 300-6. Erratum in: *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar; **308**(3): 1219

Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo).* 1999 Apr; **125**(4): 803-8.

Noethen MM, Rietschel M, Erdmann J, Oberlander H, Moiler HH, Naber D, Propping P. Genetic variation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and response to clozapine. *Lancet.* 1995; **346**: 908.

Nordström A-L, Farde L, Nyberg S, Karlsson P, Halldin C, Sedvall G: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, and 5-HT<sub>2</sub> receptor occupancy in relation to clozapine serum concentration: a PET study of schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* 1995; **152**: 1444-49.

Ozdemir V, Kalow W, Okey AB, Lam MS, Albers LJ, Reist C, Fourie J, Posner P, Collins EJ, Roy R. Treatment-Resistance to Clozapine in Association With Ultrarapid CYP1A2 Activity and the C → A Polymorphism in Intron 1 of the CYP1A2 Gene: Effect of Grapefruit Juice and Low-Dose Fluvoxamine. *J Clin Psychopharmacology.* 2001b; **21**(6): 603-7.

Özdemir V, Kalow W, Posner P, Collins EJ, Kennedy JL, Tang BK, Albers LJ, Reist C, Roy R, Walkes W, Afra P. CYP1A2 activity as measured by a caffeine test predicts clozapine and active metabolite steady-state concentration in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2001a; **21**: 398-407.

Ozdemir V, Kalowa W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, Kashuba AD. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics.* 2000; **10**: 373 - 388

- Perlis RH, Ganz DA, Avorn J, Schneeweiss S, Glynn RJ, Smoller JW, Wang PS. Pharmacogenetic testing in the clinical management of schizophrenia: a decision-analytic model. *J Clin Psychopharmacol*. 2005 Oct; **25**(5): 427-34
- Prakash C, Kamel A, Cui D, Whalen RD, Miceli JJ, Tweedie D. Identification of the major human liver cytochrome P450 isoform(s) responsible for the formation of the primary metabolites of ziprasidone and prediction of possible drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2000; **49** Suppl 1: 35S-42S.
- Prior TI, Baker GB. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J Psychiatry Neurosci*. 2003 Mar; **28**(2): 99-112. Review.
- Prior TI, Chue PS, Tibbo P, Baker GR. Drug metabolism and atypical antipsychotics. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1999; **9**:301-9.
- Raggi MA, Mandrioli R, Sabbioni C, Pucci V. Atypical antipsychotics: pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring and pharmacological implications. *Curr Med Chem* 2004; **11**: 279-96.
- Rau T, Wohlleben G, Wuttke H, Thuerauf N, Lunkenheimer J, Lanczik M, Eschenhagen T. CYP2D6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants-a pilot study. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 May; **75**(5): 386-93
- Reynolds GP, Templeman LA, Zhang ZJ. The role of 5-HT<sub>2C</sub> receptor polymorphisms in the pharmacogenetics of antipsychotic drug treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Jul; **29**(6): 1021-8. Review.
- Rietschel M, Naber D, Fimmers R, Moller HJ, Propping P, Nothen MM. Efficacy and side-effects of clozapine not associated with variation in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuroreport*. 1997; **27**;8(8): 1999-2003.
- Roberts R, Joyce P, Kennedy MA. Rapid and comprehensive determination of cytochrome P450 CYP2D6 poor metabolizer genotypes by multiplex polymerase chain reaction. *Hum Mutat*. 2000; **16**(1):77-85

Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Apr; **3**(4): 353-9.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 1999 Apr; **47**(4): 445-9.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am JHum Genet.* 1997; **60**: 284-95.

Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2005 May; **2**(5):e141. Epub 2005 May 31. Review.

Saldivia S, Torres F, Cabasés JM y Grupo PSICOST. Estimación de unidades de costes de atención sanitaria a pacientes con esquizofrenia. *Actas Esp Psiquiatr.* 2005; **33** (5):280-85

Saldivia S. Estimación del coste de la esquizofrenia asociado al uso de servicios [Tesis doctoral]. Granada: Universidad, 2000.

Schumacher J, Schulze T, Wienker T, Rietschel M, Nothen M. Pharmacogenetics of clozapine response. *Lancet.* 2000; **356**: 506–507.

Segman RH, Ebstein RP, Heresco-Levy U, Gorfine M, Avnon M, Gur E, Nemanov L, Lerer B. Schizophrenia, chronic hospitalization and the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Psychiatr. Genet.* 1997; **7**: 75– 78.

Seva A. El coste de las patologías psiquiátricas en España. Un seguimiento de 26 años y 10.974 ingresos en una Unidad Psiquiátrica de Corta Estancia de un hospital general. *Eur. J. Psychiat.* Vol. 2002; **16**, N.º 1; 57-67.

Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1994; **270**: 414-423.

Sistonen J, Fuselli S, Levo A, Sajantila A. CYP2D6 genotyping by a multiplex primer extension reaction. *Clin Chem.* 2005 Jul; **51**(7): 1291-5.

Sodhi MS, Arranz MJ, Curtis D, Ball DM, Sham P, Roberts GW, Price J, Collier DA, Kerwin R. Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *NeuroReport.* 1995; **7**: 169– 172.

Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Maekawa K, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Saitoh O, Kawai M, Ohnuma T, Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes of CYP1A2 in Japanese Population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005; **20**(1): 24-33

Spina E, de Leon J. Metabolic Drug Interactions with Newer Antipsychotics: A Comparative Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 Jan; **100**(1): 4-22.

Spurlock G, Williams J, Daniels J, Owen M, McGuffin P. The European multi-centre study of susceptibility gene associations in schizophrenia: typing the 5HT<sub>2R</sub> gene, *Psychiatr. Genet.* 1995; 5-

Stahl S. Psicofarmacología esencial. Bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas. *Ariel Neurociencia.* 2000.

Steijns LS, Van Der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clinical Chemistry.* 1998; **44** (5), 914–17.

Sullivan PF. The genetics of schizophrenia. *PLoS Med.* 2005 Jul; **2**(7): e212. Review.

Thuerauf N, Lunkenheimer J. The impact of the CYP2D6-polymorphism on dose recommendations for current antidepressants. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Aug; **256**(5): 287-93. Review.

Trevan JW. The error of determination of toxicity. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 1927; 101: 483–514.

Trichard C, Paillere-Martinot ML, Attar-Levy D, Recassens C, Monnet F, Martinot JL. Binding of antipsychotic drugs to cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptors: a PET study of chlorpromazine, clozapine, and amisulpride in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* 1998 Apr; **155**(4): 505-8.

Vallone P.M., Butler, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques.* 2004; **37**(2): 226-31.

Van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ. The effect of smoking and cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement. *Pharmacogenetics.* 2003, **13**: 169–172

Van der Weide J, Steijns LS. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; **36** (6): 722-9. Review.

Veenstra-VanderWeele, J., Anderson, G.M., Cook, E.H.,. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; **410**: 165– 181.

Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd.* 1959; **12**: 52-125.

Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4 1B5' -promoter region polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; **68**: 288 – 294.32.

Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 May 27; **259**(1): 201-5

Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, Zech K, Ingelman-Sundberg M, von Richter O. Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Apr; **79**(4): 339-49

Williams JA, Cook J, Hurst SI. A significant drug-metabolizing role for CYP3A5?. *Drug Metab Dispos.* 2003 Dec; **31**(12): 1526-30. Review

Yuan, X., Yamada, K., Ishiyama-Shigemoto, S., Koyama, W., Nonaka, K.,. Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene and their association with obesity and type II diabetes. *Diabetologia.* 2000; **43**: 373–376.

Direcciones Electrónicas:

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications>

<http://www.cypalleles.ki.se>

[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase//AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

## ANEXOS



Anexo 1

ENSAYO	PLEX	SNP_ID	Primer 2-PCR	Primer 1-PCR	Bps Frag PCR	Tm
Amplificado	W1	CYP2D6_2466	ACGTTGGATGTTTGAAGCGTAGGACCTTG	ACGTTGGATGCTGGTGTAGGTGCTGAATG	97	50.9
Amplificado	W1	CYP2D6_1659_1661#1	ACGTTGGATGTTCTGCCAGGCCAAAGT	ACGTTGGATGTTCTGGCCGGCTATGG	105	49.1
Amplificado	W1	CYP2D6_4042	ACGTTGGATGAGGAGCCAGGCTCACTGAC	ACGTTGGATGAGGTGAAGAAGGAAAGAGC	118	53.5
Amplificado	W1	CYP2D6_124_138#1	ACGTTGGATGAGCAGTATGGTGTGTTCTGG	ACGTTGGATGAACGCTGGGCTGCACGCTA	113	59
Amplificado	W1	CYP2D6_124_138#2	ACGTTGGATGAACGCTGGGCTGCACGCTA	ACGTTGGATGAGCAGTATGGTGTGTTCTGG	113	46
Amplificado	W1	CYP2D6_2097	ACGTTGGATGAGGAGTCTCTGAGGGCGA	ACGTTGGATGGGAATGTCCTTCCCAAAAC	118	45.1
Amplificado	W1	CYP2D6_2613-2615	ACGTTGGATGGGATGACCTGGGACCCAGC	ACGTTGGATGCCACCCTGGCAGCCACTC	111	54.6
Amplificado	W1	CYP2D6_845_883#2	ACGTTGGATGAATAGGACTAGGACCTGTAG	ACGTTGGATGAGGCTGAACACGCTCCCGAA	120	57.2
Amplificado	W1	CYP2D6-1584	ACGTTGGATGATTATAGGCTAGGCCACCG	ACGTTGGATGAATTCAAGACCAGCTGGAC	114	48.1
Amplificado	W1	CYP2D6_2935	ACGTTGGATGACTGTTTCCAGATGGGCTC	ACGTTGGATGCCCAGGATGGTGACCACCT	116	49.3
Amplificado	W1	CYP2D6_3183_1039#1	ACGTTGGATGAAATCTGTCTGTGCCAC	ACGTTGGATGCCACCGCCCGCTGTGC	107	52.5
Amplificado	W1	CYP2D6_1869	ACGTTGGATGGACCCTTACCAGCATCTC	ACGTTGGATGACGTTGCTCAGGGCTTTGTC	99	47.4
Amplificado	W1	CYP2D6_31	ACGTTGGATGTTGTAGTGAGGACGGTATG	ACGTTGGATGTCCACCAGGACGAGGAAGAT	99	52
Amplificado	W1	CYP2D6_2850	ACGTTGGATGCACCATCCCGCAGAGAAC	ACGTTGGATGCCCTGAGAGCAGCTCAATG	91	49.1
Amplificado	W2	CYP2D6_1707	ACGTTGGATGAACTTGGCCCTGGGCAAGAA	ACGTTGGATGTGGCGAAGGGCGCACAAAG	97	50.9
Amplificado	W2	CYP2D6_3183_3198#2	ACGTTGGATGATTTGGGGACGCATGTCTG	ACGTTGGATGATGTAGCCTGGTCAACCAT	118	48.8
Amplificado	W2	CYP2D6_1973	ACGTTGGATGAGAGACTCTCGGTCTCTCG	ACGTTGGATGCTCAGGCTGCTGGACCTA	111	46.3
Amplificado	W2	CYP2D6_3183_3198#1	ACGTTGGATGATGTGAGCCTGGTCACTG	ACGTTGGATGATTGTGGGGACGCATGTCTG	118	47.6
Amplificado	W2	CYP2D6_4180	ACGTTGGATGACAGCCCCGCCAGCCAC	ACGTTGGATGGCACAGCACAAAGCTCATAG	94	47.7
Amplificado	W2	CYP2D6_845_883#1	ACGTTGGATGAATAGGACTAGGACCTGTAG	ACGTTGGATGAGGCTGAACAGCTCCCGAA	120	45.2
Amplificado	W2	CYP2D6_2539-2542_2549#1	ACGTTGGATGAAAGGCTCAGTCAAGTCC	ACGTTGGATGCCAAAAGGCTTTCCTGACC	117	55.2
Amplificado	W2	CYP2D6_1659_1661#2	ACGTTGGATGTTCTGCCAGGCCAAAGT	ACGTTGGATGTTCTGCCAGGCCAAAGT	105	53.9
Amplificado	W3	CYP2D6_1846	ACGTTGGATGACGCTTACCAGCATCTC	ACGTTGGATGGACCCCTTACCAGCATCTC	99	50.3
Amplificado	W3	CYP2D6_100	ACGTTGGATGCTGGAAGTCCACATGCAGC	ACGTTGGATGTGGACCTGATGCACCCGC	120	52.3
Amplificado	W3	CYP2D6_1758	ACGTTGGATGCTGCTTTGTGCCCTTCTC	ACGTTGGATGTCCAGTTCGCCCTTTGTG	92	51.7
Amplificado	W3	CYP2D6_2539-2542_2549#2	ACGTTGGATGCAAAAAGGCTTTCCTGACC	ACGTTGGATGAAAGGCTCAGTCAAGTCC	117	51.5
Amplificado	W3	CYP2D6_1023_1039modT	ACGTTGGATGCACGAAATCTGTCTGTCTG	ACGTTGGATGTGTGCCATCATCCAGATCC	99	46.9
Amplificado	4-no	CYP2D6_1023_1039modC	ACGTTGGATGCACGAAATCTGTCTGTCTG	ACGTTGGATGTGTGCCATCATCCAGATCC	99	48.2
Amplificado	4 replex	CYP2D6_138COR	ACGTTGGATGAACGCTGGGCTGCACGCTA	ACGTTGGATGAGCAGTATGGTGTGTTCTGG	114	50.3
Amplificado	4 replex	CYP2D6_1023_1039modC	ACGTTGGATGCACGAAATCTGTCTGTCTG	ACGTTGGATGTGTGCCATCATCCAGATCC	99	48.2
Genómico	W1	DRD2-141C-del	ACGTTGGATGAAAGGAGTGTACCTCTCG	ACGTTGGATGCTCAAAAAGGCTTTCCTGACC	101	47.5
Genómico	W1	nv_CYP2D6_4011	ACGTTGGATGTCAGTGTGAAGGACAGCCAG	ACGTTGGATGTCATCCCTCTGTGTCTG	112	48.4
Genómico	W1	DRD2_Ser31Cys	ACGTTGGATGATCTTCTCTGTTTGGCCG	ACGTTGGATGAGCCACCACGACTCTCTC	104	55.4
Genómico	W1	nv_CYP2D6_4089	ACGTTGGATGCTGGTGTAGGTGCTGAATG	ACGTTGGATGTTTGAAGCGTAGGACCTTG	97	54.5
Genómico	W1	CYP3A4_T363M#2	ACGTTGGATGGGAGTATCTTGACATGGTGG	ACGTTGGATGCAACATCTTTTTTGCAGACCC	106	46.5
Genómico	W1	CYP3A4_P416L	ACGTTGGATGTTGAACAGGCTGGTTCAGG	ACGTTGGATGACCCAAAGTACTGGACAGAG	111	49.3
Genómico	W1	CYP3A4_R130Q	ACGTTGGATGTCACCTCTCTAGCTGAGG	ACGTTGGATGGAGTTTTCCACTGGTAGG	99	45.9
Genómico	W1	nv_CYP2D6_5811	ACGTTGGATGACAGCCCGCCAGCCAC	ACGTTGGATGACTAGGTACCCCATCTAGC	119	48.9
Genómico	W1	CYP1A2-3860G-A	ACGTTGGATGTGTAATTCAGCTACTCCGG	ACGTTGGATGAGTGCAGTGGTGCATCTTG	112	48.7
Genómico	W1	nvCYP2D6_3855	ACGTTGGATGCTCTCCTTCCAGAGAGG	ACGTTGGATGACAGGAGAGGCCAAGGAC	101	54
Genómico	W1	nvH2_1820	ACGTTGGATGATGGGATGAGGACCGCAAG	ACGTTGGATGGGCACAGCCTTCTCCTTGG	100	47.9
Genómico	W1	CYP3A4_T185SmodC	ACGTTGGATGCACCTTCTTCCACTGAGC	ACGTTGGATGTCGATGTTCACTCCAGATG	100	50.9
Genómico	W1	nvH2_1940	ACGTTGGATGGAGTTAAGAATGGAGCGTG	ACGTTGGATGAGCTTTGGCAAGTCTTGG	95	49.1
Genómico	W1	nv_CYP2D6_4398	ACGTTGGATGTCATTGAAGTCTCTCAGG	ACGTTGGATGAGAATGGAGGTCATTGGG	117	53.9
Genómico	W1	nv3A4_15610_15635#2	ACGTTGGATGAAATCAGCACCTTTTACC	ACGTTGGATGGTGGCTGTTGCTGTCTTG	101	47.1
Genómico	W1	CYP3A5-6985A-G	ACGTTGGATGGTAATGTGTCCAAACAGG	ACGTTGGATGACCCAGCTTAAACGATGCT	118	47.7
Genómico	W1	CYP2C19_681G-A	ACGTTGGATGGCAATAATTTCCACTATC	ACGTTGGATGCACCTTCCATAAAGGCAAG	101	46.5
Genómico	W1	DRD3_rs1486012	ACGTTGGATGACCTGGTCTTTGATCCTG	ACGTTGGATGTCACAAGGGCTTACCCTAAC	113	45.9
Genómico	W1	nv_CYP2D6_4280	ACGTTGGATGAGATGGAGAAGGTGAGAGT	ACGTTGGATGGTCCAACTTTCGCCAG	119	57
Genómico	W1	DRD3_rs2134655	ACGTTGGATGACACCGACTTTGGAATCTCG	ACGTTGGATGAGGCTCTAGAGGCAACTATC	110	45.4
Genómico	W1	5HT2C_CYS235SER	ACGTTGGATGTCAGTGTGCACCTAATTTGC	ACGTTGGATGGTACTATAGCTGCTAGG	93	48.9
Genómico	W1	5HT2A_102T-C	ACGTTGGATGATTTTCCAGAGTCACTGTCC	ACGTTGGATGCCAGGCTTACAGTAATGAC	100	51.2
Genómico	W1	H2-1018G-A	ACGTTGGATGATCTGGTGTGCTGTTTGG	ACGTTGGATGACGTTTATACCTGACCC	110	46.2
Genómico	W1	CYP3A4_L293P	ACGTTGGATGCACTGCTGTGTTTCATAG	ACGTTGGATGCTTCTCCTCTTTCAGCTC	109	54.4
Genómico	W1	CYP3A4-392	ACGTTGGATGATGAGGACAGCCATAGAGAC	ACGTTGGATGATCAGAACTCAAGTGAGGC	101	47.1
Genómico	W1	CYP3A4_1461ins	ACGTTGGATGAATTCAGGCTCCACTTACGG	ACGTTGGATGTTAGGAGGACTTCTCAACC	102	50.6
Genómico	W1	nvH2_2060	ACGTTGGATGCAGGTCAGTGATGCCAAGG	ACGTTGGATGAATGTGGTCTGTCTGGC	110	60.7
Genómico	W1	CYP2C19_636G-A	ACGTTGGATGAACATCAGGATGTAAAGC	ACGTTGGATGGACTGTAAGTGGTTCCTCAG	95	53.7
Genómico	W2	CYP1A2-163C-A	ACGTTGGATGCCCTTCCAGCTCTCAGATT	ACGTTGGATGCTAAGCTCCATCTACCATGC	97	45.8
Genómico	W2	DRD3_RS6280	ACGTTGGATGTGGCACCTGTGGAGTCTCT	ACGTTGGATGCTGGCCTATGGCATCTCTG	98	47.8
Genómico	W2	CYP1A2-739T-G	ACGTTGGATGTCAGAGCTGGGTAAGCAAG	ACGTTGGATGTAGAACCCTGGAAGTGTGG	111	47.2
Genómico	W2	CYP1A2_558C-A	ACGTTGGATGATGACGTTGGCCACTGACAC	ACGTTGGATGTATCAGCAGTTGCGAGGAG	105	54.2
Genómico	W2	CYP1A2_3534G-A	ACGTTGGATGCTTCTGACTGCTGAACCTG	ACGTTGGATGTAACCAGTGGCAGGTCAAC	100	50
Genómico	W2	CYP3A5_14690G-A	ACGTTGGATGGCCACATACTTTTGAAGAG	ACGTTGGATGTCAACAATCCACAAGACCCC	114	45.4
Genómico	W2	MDR1_C3435T	ACGTTGGATGGCTGAGAATGCTCATGAG	ACGTTGGATGATGTTGGCCCTCTTGTGCT	101	53.5
Genómico	W2	DRD3_rs7631540	ACGTTGGATGGCTTTGTGTGAGTGAATTTCC	ACGTTGGATGGTCAATTTCCACTGTGGCC	98	45.8
Genómico	W2	CYP1A2_634A-T	ACGTTGGATGATGAGTGTCTTCCAGGAGC	ACGTTGGATGAACGCTCATGTTGGCATGTG	101	45.7
Genómico	W2	nv_CYP2D6_5472	ACGTTGGATGTCATCACCACCTGTCACTG	ACGTTGGATGCATCCAGGAAGTGTTCGGG	104	52.3
Genómico	W2	MDR1_G2677A-T	ACGTTGGATGTGTTGTCTGGACAAGCACTG	ACGTTGGATGCATATTTAGTTTGACTCAC	92	47.6
Genómico	W2	CYP3A4_T363M#1	ACGTTGGATGGGAGTATCTTGACATGGTGG	ACGTTGGATGCAACATCTTTTTTGCAGACCC	106	46.8
Genómico	W2	DRD3_rs963468	ACGTTGGATGTCAGAGTTTCTCTTGGCAC	ACGTTGGATGGCAGTCTAGGCAAAATCAC	99	45.4
Genómico	W2	CYP3A4_T185SmodT	ACGTTGGATGTTCTCCACTCAGCGTCTTTG	ACGTTGGATGAGAGAGTGCATGTTCACTCC	98	50.2
Genómico	W3	nv3A4_15610_15635#1	ACGTTGGATGGTGGCTGTTGTCTGTCTTG	ACGTTGGATGAAATCAGCACCTTTTTTACC	101	49.1
Genómico	W3	CYP3A4_T185S#2	ACGTTGGATGTTTCCACTCAGCGTCTTTG	ACGTTGGATGGTGGATTTGAGAGAGTGC	109	50.8
Genómico	W3	5HT2A_HIS452TYR	ACGTTGGATGTGACTGCTCAATGGTTGCTC	ACGTTGGATGCTTTTCACTCCTCCGCGC	99	47.8

Tabla 50: Primers utilizados en la PCR Multiplex para el genotipado mediante Sequenom®. La primera columna muestra el ensayo de que se trata (a partir de DNA Genómico o preamplificado); la segunda columna muestra la "Plex" de que se trata; la tercera indica el ID del SNP tipado; las columnas cuarta y quinta contienen las secuencias de los primers de PCR; la sexta el tamaño en pares de bases del producto amplificado y la cuarta la Temperatura de Melting.



Anexo 3

SNP	Nombre Sequenom	¿Sequenom?	*1	*2A	*2B	*2D	*3	*4A	*4B	*4D	*4J	*4K	*6	*6C	*7	*8	*9	*10A	*10B	*11	*12	*14A	*14B	*15	*17	*19	*20	*25	*26	*29	*30	*31	*35	*36	*40	*41
-1584C>G	CYP2D6_1584	SI	C	G	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
31G>A	CYP2D6_31	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
100C>T	CYP2D6_100	SI	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
124C>A	CYP2D6_124_138#1		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
138insT	CYP2D6_124_138#2	SI	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	
883G>C	CYP2D6_845_883#2	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1023C>T	CYP2D6_1023_1039#1	SI	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1039C>T	CYP2D6_1023_1039#2	SI	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1689G>A	CYP2D6_1659_1661#1	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1661G>C	CYP2D6_1659_1661#2	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1707T>del	CYP2D6_1707	SI	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	del	del	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
1758G>T	CYP2D6_1758	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1758G>A	CYP2D6_1758	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1846G>A	CYP2D6_1846	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1973_1974insG	CYP2D6_1973	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2539>2542delA	CYP2D6_2539-2542_2549#1	SI	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Del
2549A>del	CYP2D6_2539-2542_2549#2	SI	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT	AACT
2613>2615delA	CYP2D6_2613-2615	SI	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA
2880C>T	CYP2D6_2850	?	C	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
2935A>C	CYP2D6_2935	SI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3183G>A	CYP2D6_3183_3198#1	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3198C>G	CYP2D6_3183_3198#2	SI	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
3277I>C	No	No																																		
4042G>A	CYP2D6_4042	SI	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
*56C	No	No																																		
4180G>C	CYP2D6_4180	SI	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1663Repeats	No	¿Sequenar? Si hace falta																																		

Tabla 26 A. Matriz de combinaciones haplotípicas de los alelos de CYP2D6 y SNPs necesarios para su genotipado. Las filas resaltadas en rojo corresponden a SNPs que no pueden ser tipados utilizando la técnica de Sequenom® y deberán ser analizados por secuenciación en caso de que fuese necesario. Las posiciones resaltadas en gris y amarillo corresponden a SNPs cuya presencia define alelo de forma directa y unívoca, a la posibilidad de varios SNPs multialélicos.

Anexo 4

Cambio	CYP1A2 *1K	CYP1A2 *7	CYP1A2 *11	CYP1A2 (*1F/*1CYP1A2 *1C	CYP1A2 *12	CYP2C19 *3	CYP2C19 *2
CYP1A2_3880C G>A	-	-	-	-	-	CYP2C19_636G-A	+
729 C>T	+	-	-	-	-	CYP2C19_681G-A	-
CYP1A2_3534C G>A	-	+	-	-	-		+
CYP1A2_558C C>A	-	-	-	-	-		
CYP1A2_163C C>A	+	-	+	-	-		
CYP1A2_739T T>G	-	-	-	-	-		
CYP1A2_634A A>T	+	-	-	-	-		

Nombres Sequenom	CAMBIO	CYP3A4 *1B	CYP3A4 *17	CYP3A4 *18	CYP3A4 *20	CYP3A4 *8	CYP3A4 *16A	CYP3A4 *11
CYP3A4_L293P	A>G	-	+	-	-	-	-	-
CYP3A4_F189S (T>C)	T>C	-	-	-	-	-	-	-
CYP3A4_392	A>G	+	-	-	-	-	-	-
CYP3A4_1461ins	insA	-	-	-	+	-	-	-
CYP3A4_P416L	C>T	-	-	-	-	-	-	-
CYP3A4_R130Q	G>A	-	-	-	+	-	-	-
CYP3A4_T185SmodC	C>G	-	-	-	-	+	-	-
CYP3A4_T363M#2	C>G	-	-	-	-	-	+	-
CYP3A4_T185S#2	C>G	-	-	-	-	-	+	-

Cambio	CYP3A5 *6	CYP3A5 *3 (*10 /*11)
CYP3A5_14690G-A	+	-
CYP3A5_6985A-G	-	+

Cambio	CYP3A5 *3
H2-1018G-A	G>A

Cambio	CYP3A5 *3
5HT2C_CYS23SER	G>C

Cambio	CYP3A5 *3
MDR1_C3435T	C>T
MDR1_G2677A-T	G>A/T

Cambio	CYP3A5 *3
DRD2_Ser311Cys	C>G
DRD2_141C-del	C>del

Cambio	CYP3A5 *3
DRD3_RS6280	C>T
DRD3_rs7631540	C>T
DRD3_rs963468	A>G
DRD3 rs2134655	A>G
DRD3 rs1486012	A>T

Cambio	CYP3A5 *3
rs 10456429	T/T Metabolismo reducido
	T/T Metabolismo reducido

Cambio	CYP3A5 *3
nv_CYP2D6_4011	G>A
nv_CYP2D6_4089	T>C
nv_CYP2D6_4280	G>A
nv_CYP2D6_4398	G>A
nv_CYP2D6_5811	T>C
nv3A4_15610_15635#1	G/a/c/t,
nv3A4_15610_15635#2	G/a/c/t,
nvCYP2D6_3855	T>C
nvH2_1820	C/g/t/a
nvH2_1940	T/a/g/c
nvH2_2060	G/a/c/t
nv_CYP2D6_5472	G>A
nvCYP2D6_3855	T>C

Cambio	CYP3A5 *3
5HT2A_102T-C	T>C
5HT2A_HIS452TYR	C>T

Cambio	CYP3A5 *3
DRD3 rs1486012	A>T

Cambio	CYP3A5 *3
DRD3 rs1486012	A>T

Tabla 26 B: Polimorfismos de genes distintos a CYP2D6 tipados mediante Sequenom y, en caso de que proceda, alelos que definen. A: Gen CYP1A2; B: Gen CYP2C19, C: Gen CYP3A4; D: Gen CYP3A5; E: Gen del receptor 5HT2A; F: Gen del receptor 5HT2C; G: Gen del receptor 5HT2C; H: Gen del receptor DRD5; I: Posiciones no Variables utilizadas para determinar la dosis de CYP2D6; J: Gen MDRI, K Gen del receptor DRD2. Nótese que algunas de estas variables no han sido incluidas en el estudio y se muestran con fines informativos, ya que formarán parte de diseños posteriores debido a su importancia farmacogenética.