

**Artículo de
investigación**

Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México

RUTH ELIZABETH ALANIS BAÑUELOS, ISMAEL LARES ASSEFF, MARTHA SOSA
MACÍAS, FRANCISCO BRADLEY ÁLVAREZ, BLANCA LAZALDE RAMOS

INTRODUCCIÓN

La isoenzima CYP2D6 metaboliza 75 diferentes fármacos que actúan particularmente en el Sistema Nervioso Central y en el Sistema Cardiovascular (1), asimismo, cataliza la biotransformación oxidativa de pesticidas organofosforados como el paratión y el diazinon (2), y contribuye en la activación de una nitrosamina específica del humo del tabaco

(NNK), que es considerada como un potente carcinógeno (3). El gen CYP2D6 contiene más de 75 alelos identificados a la fecha, los cuales se pueden consultar en la página electrónica <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/> (4). Los alelos defectuosos más comunes, que traen como consecuencia una ausencia de la enzima CYP2D6 o una alteración de su

RESUMEN

CYP2D6 metaboliza diferentes fármacos y otros xenobióticos, el gen que la codifica (CYP2D6) es altamente polimórfico, y el factor principal de la variada actividad enzimática que se ve reflejada en diferentes fenotipos como metabolizadores rápidos (MR) y metabolizadores lentos (ML). No existen estudios previos de genotipificación del CYP2D6 en los menonitas mexicanos del estado de Durango. Nuestro objetivo fue identificar las frecuencias de los alelos CYP2D6*4, *6 y *10 en 21 individuos menonitas que fueron genotipificados mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). Las frecuencias de los alelos *4 y *10 fueron de 0.21 y 0.05 respectivamente. El alelo *6 no fue identificado en ningún individuo estudiado. Conclusiones: Las frecuencias de las variantes alélicas *4 y *10 en menonitas fueron similares a las reportadas en caucásicos. El patrón genotípico identificado en este estudio predice un 4.8% de ML en esta población, similar a la frecuencia de ML observada en caucásicos de Europa y Norteamérica (5-10%).

Palabras clave: polimorfismo del CYP2D6, variante alélica, menonitas mexicanos, grupos étnicos.

ABSTRACT

The isoenzyme CYP2D6 metabolize different drugs and other xenobiotics compounds. The CYP2D6 gene locus is highly polymorphic, and results in variable enzymatic activity reflected in different phenotypes like ultrarapid metabolizer (UM) and poor metabolizer (PM). Far less, there is not information about CYP2D6 genotyping in the Menonitas population from the Durango State. The aim of the present work was to identify the allele frequencies of CYP2D6*4, *6 and *10 in 21 Mexican Menonitas by PCR and RFLP. The frequencies of the CYP2D6*4 and CYP2D6*10 alleles were 0.21 and 0.05 respectively. The *6 was not identified in any of the studied individual. The allelic frequencies of the variants *4 and *10 in Mexican Menonitas were similar with the frequencies reported to Caucasians. The detection of this genotype allows predicting 4.7% of PM in this population, similar to the frequency of PM observed in Europe and North America Caucasians (5-10%).

Key Words: phenotype; CYP2D6 polymorphisms; allele frequency; mexican menonitas, ethnic groups

actividad enzimática son CYP2D6*3, *4, *5 *10 y *17. El polimorfismo genético de esta enzima micosomal origina distintos subgrupos de individuos en la población: metabolizadores rápido (MR), metabolizadores intermedios (MI) y metabolizadores lentos (ML), que difieren en la capacidad para llevar a cabo una cierta reacción de oxidación.

La frecuencia del fenotipo ML difiere de acuerdo al grupo étnico. En población caucásica, del 5 al 10% de los individuos son ML (5), en africanos, la frecuencia es del 0 al 19% (6), mientras que en asiáticos no es mayor al 1%. En un estudio que realizamos en mestizos del estado de Durango, México, la frecuencia fue del 6.8% (7), cercana a la obtenida en mestizos de la ciudad de México D.F. (10%) (8). Se han estudiado algunas tribus indígenas genéticamente homogéneas como los Cuna y Ngawbe de Panamá, así como los Embera de Colombia, los cuales muestran una frecuencia de ML de 0, 5.2 y 2.2% respectivamente (9-11), y recientemente nuestro grupo realizó un estudio en indígenas Tepehuanos del estado de Durango en quienes no se identificó dicho fenotipo (7).

MENONITAS

Los menonitas mexicanos son descendientes de Holandeses que se establecieron en el Municipio de Nuevo Ideal, Durango, desde el año de 1924. Se encuentran en un área de 24,000 hectáreas donde están instaladas 32 colonias, con una población aproximada de 15,000 habitantes. Todas las comunidades asumieron un aislamiento cultural y genético, que se remite a los siglos XVIII y XIX (12).

La gran diversidad de grupos étnicos, su importancia y presencia en el Estado de Durango hacen atractiva la investigación y el estudio de una de las étnicas con mayor presencia en el estado. Tal es el caso de la etnia Menonita, la cual presenta un fondo genético diferente al resto de la población (13), por lo que determinar el polimorfismo genético de CYP2D6 es un factor importante para detectar posibles diferencias interindividuales e interétnicas en la capacidad para metabolizar medicamentos y otros xenobióticos. Al mismo tiempo es posible identificar individuos y poblaciones que pudieran presentar mayor riesgo a efectos tóxicos por exposición a xenobióticos, así como desarrollar ciertas patologías.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Se estudió un grupo de 21 voluntarios menonitas de origen caucásico (11 mujeres de 23 a 69 años y 10 hombres de 22 a 80 años), no relacionados, habitantes del municipio de Nuevo Ideal en el Estado de Durango, México. Una vez que se les informó el objetivo del estudio, cada individuo que aceptó participar en el estudio, firmó la carta de consentimiento informado por escrito en su propio lenguaje.

Este trabajo fue aprobado por un Comité de Ética e investigación reconocido por la Secretaría de Salud.

Aislamiento de ADN

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante el uso de tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. El ADN genómico se aisló a partir de 5mL de sangre total mediante el método de extracción de perclorato de sodio/cloroformo

(14). Las muestras de sangre se mezclaron con 35mL de solución amortiguadora de lisis (sacarosa 320mM, MgCl₂ 5mM, Tritón X-100 al 1% (v/v) y Tris-HCl 10mM, pH 8). Se obtuvo un precipitado mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 min, el cual se resuspendió en 2mL de solución amortiguadora B (NaCl a 150mM, EDTA 60mM, SDS al 1% (w/v) y 400mM de Tris-HCl, pH 8). La suspensión se mezcló con 0.5mL de perclorato de sodio 5M y se incubó a 65°C durante 30min. Despues de la incubación, se le adicionaron 2mL de cloroformo y la mezcla fue centrifugada a 1400 x g durante 10min. La fase acuosa con el ADN, se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100%, se invirtió el tubo lentamente varias veces hasta observar una madeja transparente, la cual se capturó con un asa estéril en un tubo de 0.5mL, finalmente se lavó con 0.5mL de etanol al 70% y se centrifugó a 1400 x g. El ADN se secó en un concentrador (SAVANT) y se resuspendió en 200mL de una solución de Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM, pH 7.4, se cuantificó mediante espectrofotometría a una de 260 nm.

Procedimiento de Genotipificación

Para la determinación de las variantes aleáticas del CYP2D6 (CYP2D6*4, CYP2D6*6 y CYP2D6*10), se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico de 2900pb que contiene los exones 1 al 5 del CYP2D6, con los iniciadores 5'CCAGAAGGCTTGAGGCTTCA3' (forward) y 5'GGCTGGTCCCAGGTACATAC3' (reverse). La reacción de amplificación de PCR (50 L) contenía 0.2 mM desoxiribonucleosidos trifosfatos (dNTPs), 1.5 mM de MgSO₄, 0.5 mM de cada iniciador, ~50ng de ADN genómico y 2.5U Taq ADN polimerasa (High Fidelity Platinum). Las condiciones del amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturización a 94oC por 1 min, 35 ciclos de 94oC por 30s, 62.4oC por 30 s y 68oC por 3 min, seguidos por 1 min a 68oC para la extensión final.

Detección de los alelos CYP2D6*4 y CYP2D6*6

Para detectar la mutación G1934 del alelo *4 y T1795 del alelo *6, se realizó una PCR anidada utilizando como templado el amplicón de 2900pb y los iniciadores siguientes 5' CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGACCAAG 3' (forward) y 5' GAGACTCCTCGGTCTCTCG 3' (reverse) con los que se amplificó un fragmento de 353 pb. La reacción de amplificación se realizó como se describió previamente. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturización a 95OC por 5 min, 35 ciclos a 94OC por 30 s, 56OC por 10 s y 72OC por 10 min, seguidos por 5 min a 70OC para la extensión final. Los productos de PCR amplificados se cortaron con la enzima de restricción BstNI al incubar la reacción a 60oC durante dos horas. El alelo silvestre *1 genera dos bandas de 190 y 163pb, mientras que el alelo mutado *4 permanece íntegro (353pb) (15). El alelo mutado *6 se corta en tres bandas de 190, 139 y 23pb (15). Los resultados del RFLP se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% contenido bromuro de etidio. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (BIO RAD 2000), y captadas en un sistema de digitalización de imágenes (Digi Doc BIO RAD).

CUADRO I. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DEL CYP2D6 EN 21 SUJETOS MENONITAS MEXICANOS

Genotipo	Número de Individuos	† Frecuencia Relativa
*1/*1	12	0.57
*1/*4	7	0.33
*4/*4	1	0.05
*10/*10	1	0.05
	21	

† No. de individuos / No. total.

CUADRO II. FRECUENCIA ALÉLICA DEL CYP2D6 EN 21 SUJETOS MENONITAS MEXICANOS

Alelo	Sil/Sil	Sil/Mt	Mt/Mt	‡ Frecuencia alélica
*4	13 (62)	7(33.3)	1(4.8)	0.21
*6	21 (100)	0	0	0
*10	20 (95.2)	0	1(4.8)	0.05

‡ Frecuencia del alelo variante= (alelos monocigotos mutados x 2 + alelos heterocigotos)/ sujetos totales x 2

Sil= silvestre, Mt= mutado,(%)

Detección del alelo CYP2D6 *10

Se utilizó el fragmento de 2900pb como templado para realizar una reacción de PCR anidada, e identificar la mutación C188T presentes en el alelo *10, con el uso de los iniciadores 5' TCAACACAGCAGGTTCA3' (forward) y 5' CTGTGGTTTCACCCACC3' (reverse) con los que se amplificó un fragmento de 433 pb. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95OC por 7 min, 35 ciclos a 94OC por 30 s, 67OC por 15 s y 72OC por 20 min, seguidos por 70OC por 8 min para la extensión final. Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción HphI al incubarlos a 37OC durante dos horas. El alelo silvestre *1 genera dos bandas de 360 y 71pb, mientras que el alelo mutado *10 se corta en tres bandas de 262, 100 y 71pb (15). Su visualización se realizó como se describió anteriormente.

RESULTADOS

Se determinó la frecuencia alélica de las variantes CYP2D6*4, *6 y *10, en 21 sujetos menonitas. Después del genotipo *1/*1 (0.57), el más frecuente fue el *1/*4 (0.33), el genotipo *4/*4 solo se identificó en una persona al igual que el *10/*10 (0.05) (Cuadro I). Entre las variantes alélicas estudiadas la más común fue la *4 (0.21) (Cuadro II), este alelo inactivo aparece con una frecuencia del 20 al 25% en Caucásicos. El alelo *6 no se identificó en ningún individuo estudiado. La frecuencia de la variante alélica *10 (0.05) en esta población fue similar a la descrita en población Rusa (0.042) (16) y más alta que la descrita en Alemanes (0.015) (15).

DISCUSIÓN

Este estudio es la primera investigación enfocada a determinar el genotipo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del Estado de Durango. El genotipo *1/*1 predominó en la población estudiada (0.57), el alelo *1 se ha identificado como el alelo silvestre del CYP2D6 el cual se podría considerar como el ancestral que nos ha proporcionado ventajas evolutivas. La frecuencia del alelo inactivo *4 en esta población fue de 0.21, similar a la observada en polacos (0.23) (17), rusos (0.18) (16) y alemanes (15). Este alelo inactivo es el responsable del 70 al 90% de los ML en

esta población. Sin embargo, en orientales, la frecuencia de dicho alelo es de solo 0.01 o menos (18-20), mientras que en africanos y afro-americanos la frecuencia es de 0.07 (21-22). El alelo *6 no fue identificado en ningún individuo estudiado y se ha descrito una frecuencia menor al 0.015 en Caucásicos (15,16,23). El alelo *10, solo se ha descrito en turcos, rusos y alemanes con frecuencias de 0.06, 0.042 y 0.01 respectivamente y es responsable del 10-20% de los individuos MI en estas poblaciones (15,16,24,25), mientras que en orientales su frecuencia excede el 50% (26,27).

Como puede observarse en el cuadro II, solo un individuo presentó el genotipo *4/*4, el cual corresponde a un fenotipo ML y a una frecuencia del 4.8% de la población estudiada, que es cercana a la frecuencia de ML observada en los caucásicos de Europa y Norteamérica (5-10%) (5).

Esta información genética promete optimizar el tratamiento farmacológico al disminuir potencialmente el número de eventos adversos y mejorar la respuesta terapéutica a través de una dosis individualizada que tome en cuenta el genotipo del CYP2D6 de cada paciente, con el cual algunos individuos se comportan como ML, MI o MR. El uso de la genotipificación para determinar el estado metabólico de la enzima CYP2D6, así como el estado metabólico de otras importantes enzimas polimórficas metabolizadoras de fármacos, será una parte integral del cuidado de cada paciente y de su manejo terapéutico.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la población menonita posee una frecuencia de los alelos CYP2D6*4 y CYP2D6*10 similar a la descrita en estudios previos en poblaciones de origen Caucásico.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Conacyt (Número de proyecto: G34049-M). También agradecemos a la comunidad Menonita de Nuevo Ideal Durango por su gran apoyo y participación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry". *Arch Pharmacol*, 2004, 369:23-37.
2. Sams C, Mason HJ, Rawbone R. "Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochrome P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes". *Toxic Lett*, 2000, 116:217-221.
3. Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. "A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6". *Carcinogenesis*, 1991, 12;(7) 1197-1201.
4. Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.imm.ki.se/cypalleles/>.
5. Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*, 1999, 9:669-682.
6. Masimirembwa CM, Hasler JA. "Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in African populations: implications for the use of neuroleptics and antidepressants". *Brain Res Bull*, 1997, 44:561-571.
7. Sosa-Macias M, Elizondo G, Flores-Perez C, Flores-Perez J, Bradley-Alvarez F, Alanis-Bañuelos RE, Lares-Asseff I. "CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico". *J Clin Pharmacol*, 2006, 46:527-36.
8. López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. "CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population". *Eur J Clin Pharmacol*, 2005, 61:749-754.
9. Arias TD, Jorge LF, Lee D, Barrantes R, Inaba T. "The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama: absence of evidence for deficient metabolizers". *Clin Pharmacol Ther*, 1988, 43:456-465.
10. Arias TD, Inaba T, Cooke RG, Jorge LF. "A preliminary note on the transient polymorphic oxidation of sparteine in the Ngawbe Guaymí Amerindians: a case of genetic divergence with tentative phylogenetic time frame for the pathway". *Clin Pharmacol Ther*, 1988, 44:343-351.
11. Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. "Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations". *Pharmacogenetics*, 1999, 9:217-228.
12. Arredondo López Adelina. Pasado y presente de los menonitas mexicanos. *Méjico desconocido*, 1995, noviembre 225, también disponible en: www.mexicodesconocido.com.mx/espanol/cultura_y_sociedad/fiestas_y_tradiciones/detalle.cfm?idpage=3720&idsec=15&idsub=68.
13. Jaworski MA, Severini A, Mansour G, Konrad H.M, Slater J, Hennig K, Schlaut J, Yoon JW, Pak CY, Maclare N, et al. "Genetic conditions among canadian mennonites: evidence for a founder effect among the old colony (chortitz) mennonites". *Clin Invest Med*, 1989, 12: (2)127-41.
14. Daly AK, Monkman SC, Smart J, Steward A, Cholerton S. "Analysis of Cytochrome P450 Polymorphisms", en: "Philips IR y Shephard EA, compiladores". *Cytochrome P450 Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Totowa NJ; 1998. 406-408.
15. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. "Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: Allele frequencies and Phenotypic consequences". *Am J Hum Genet*, 1997, 60:284-295.
16. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. "Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a russian population". *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 59: (4) 303-312
17. Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, Forkasiewicz Z. "CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a polish population". *Eur J Clin Pharmacol*, 2002, 58: (8) 533-535.
18. Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. "Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6". *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53: 410-418.
19. Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. "Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation". *Mol Pharmacol*, 1994, 46: 452-459.
20. Dahl ML, Yue QY, Roh HK, Johansson I, Sawe J, Sjoqvist F, Bertilsson L. "Genetic analysis of CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects". *Pharmacogenetics*, 1995, 5: 159-64.
21. Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. "CYP2D6 phenotype-genotype relationship in African-Americans and Caucasians in Los Angeles". *Pharmacogenetics*, 1998, 8:529-541.
22. Griese UE, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. "Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population". *Pharmacogenetics*, 1999, 9:715-723.
23. Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramiski I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A. "Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in Croatian population". *Croat Med J*, 2002, 44: (4) 425-428.
24. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmoller J. "Low frequency of detective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population". *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 66: (2)185-192.
25. Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuven T, Eichelbaum M. "Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population". *Pharmacogenetics*, 1998, 8:15-26.
26. Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. "Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6". *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53: 410-418.
27. Armstrong M, Idle JR, Daly AK. "A polymorphic CfoI site in exon 6 of the human cytochrome P450 CYP2D6 gene detected by the polymerase chain reaction". *Hum Genet*, 1993, 91:616-617.

RUTH ELIZABETH ALANIS-BÁÑUELOS Q.F.B.¹ISMAEL LARES-ASSEFF DR. EN C.¹MARThA SOSA-MACÍAS DRA. EN C.¹FRANCISCO BRADLEY-ÁLVAREZ MED.¹BLANCA LAZALDE-RAMOS Q.F.B.^{1,2}

1 Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del IPN Unidad Durango, CIIDIR-IPN, México.

2 Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular, Universidad Autónoma de Zacatecas, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Correspondencia: Dra. en C Martha Sosa-Macías,
Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional del IPN Unidad
Durango.

Calle Sigma S/N Fracc. 20 de Noviembre II

Durango, Dgo., México. C.P. 34200

Tel. (618) 8142091

e-mail: msosam73@yahoo.com.mx