

Variantes alélicas *3,*4,*5 y *6 del gen *CYP2D6* en una muestra de pacientes cubanos con esquizofrenia

Allelic variants *3, *4, *5 and *6 of gene *CYP2D6* in a sample of Cuban patients with schizophrenia

Hilda Roblejo Balbuena^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-5895-8057>

Beatriz Marcheco Teruel¹ <https://orcid.org/0000-0001-6009-0405>

Giselle Monzón Benítez¹ <https://orcid.org/0000-0001-9324-0772>

Lilia C. Marín Padrón¹ <https://orcid.org/0000-0001-9819-4648>

Antonio A. Esperón Álvarez¹ <https://orcid.org/0000-0002-6806-4874>

Teresa Collazo Mesa¹ <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>

Adrián Llerena Ruíz² <https://orcid.org/0000-0002-5663-7081>

¹Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

²Universidad de Extremadura. España.

*Autor para la correspondencia: hilda.robledo@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El gen *CYP2D6* codifica la proteína de igual nombre, enzima principal del complejo de citocromos P-450 en la fase I del metabolismo de muchos medicamentos ampliamente usados en la práctica clínica, entre los que se encuentran los neurolépticos. Las variantes alélicas que implican una función nula de esta enzima: *3, *4, *5, y *6, predicen entre el 93-97,5 % de los posibles fenotipos metabolizadores lentos, que implican acumulación de concentraciones tóxicas y, por consiguiente, mayor riesgo de reacciones adversas. Por otro lado, hay estudios que reportan una baja frecuencia de metabolizadores lentos en pacientes con esquizofrenia.

Objetivo: Evaluar la asociación entre las variantes no funcionales del gen *CYP2D6* con la esquizofrenia en pacientes cubanos.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles. En el grupo de los casos se incluyeron 212 pacientes con esquizofrenia, y en los controles 326 voluntarios sanos.

Resultados: Las frecuencias de los alelos *CYP2D6* con actividad enzimática nula fueron similares entre los casos y los controles. No se detectó una diferencia estadísticamente significativa de metabolizadores lentos entre los pacientes con esquizofrenia ni en los voluntarios sanos.

Conclusiones: En este estudio, el fenotipo predictivo metabolizador lento del gen *CYP2D6* no resultó un factor de predisposición a la esquizofrenia.

Palabras clave: citocromo P-450 *CYP2D6*; esquizofrenia; farmacogenética; frecuencia alélica.

ABSTRACT

Introduction: The *CYP2D6* gene encodes the namesake protein, the main enzyme in the complex of cytochromes P-450 in phase I of the metabolism of many drugs widely used in clinical practice, among them the neuroleptics. The allelic variants implying a null function of this enzyme: *3, *4, *5 and *6, predict 93%-97.5% of the possible slow metabolizer phenotypes, which cause an accumulation of toxic concentrations and therefore a higher risk of adverse reactions. On the other hand, a number of studies report a low frequency of slow metabolizers in patients with schizophrenia.

Objective: Evaluate the association between the non-functional variants of the *CYP2D6* gene and schizophrenia in Cuban patients.

Methods: A case-control study was conducted. The case group was composed of 212 patients with schizophrenia, whereas the controls were 326 healthy volunteers.

Results: The frequencies of *CYP2D6* alleles with null enzymatic activity were similar in the two groups. A statistically significant difference of slow metabolizers was not found among patients with schizophrenia or healthy volunteers.

Conclusions: In the study conducted, the slow predictive metabolizer phenotype of the *CYP2D6* gene was not a predisposing factor for schizophrenia.

Keywords: cytochrome P-450 *CYP2D6*; schizophrenia; pharmacogenetics; allele frequency.

Recibido: 06/05/2019

Aceptado: 06/12/2019

Introducción

En el campo de la farmacogenética una de las enzimas mejor caracterizadas es *CYP2D6*, perteneciente al complejo enzimático citocromo P-450. Esta proteína, codificada por el gen de igual nombre, *CYP2D6*, es responsable del metabolismo mediante procesos de hidroxilación o de alquilación de alrededor del 20 % de los medicamentos de uso común, entre los que se encuentran los neurolépticos.⁽¹⁾

La enzima *CYP2D6* se localiza en la mayoría de las células, pero su concentración varía entre los diferentes tipos de tejidos. Aunque se expresa fundamentalmente en el hígado, su localización en el cerebro es altamente pertinente para asociarla con la predisposición a enfermedades neuropsiquiátricas, ya que se ha reportado que participa también en la biotransformación de varios neurotransmisores, como la dopamina y la serotonina, funcionalmente involucrados en los trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia. Con esta premisa, los polimorfismos del gen que la codifican, se han relacionado con rasgos de personalidad: ansiedad, astenia, agresividad y socialización.⁽²⁾ También se han asociado con la esquizofrenia, enfermedad multifactorial, altamente poligénica con un complejo conjunto de *loci* de riesgo, en la que se supone entre varias hipótesis un trastorno de la señalización neuronal.⁽³⁾

En general se conocen tres fenotipos principales en relación con la respuesta individual a los medicamentos metabolizados por esta enzima: metabolizadores normales (MN), lentos (ML) y ultrarrápidos (MU). Los ML tienen riesgo de acumulación de concentraciones tóxicas de medicamentos, mientras que los MU tienen riesgo de recibir un tratamiento insuficiente, con dosis inadecuadas para el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas del fármaco en el rango terapéutico. Del 93 al 97,5 % de los fenotipos ML son producidos por la combinación en el genotipo de cuatro alelos: *CYP2D6**3, *4, *5, y *6.⁽⁴⁾ En relación con este biomarcador farmacogenético, en el año 2010 Llerena y otros publicaron la frecuencia de individuos ML en una muestra de voluntarios sanos cubanos. El estudio reportó frecuencias de 3,9 % en cubanos mestizos y 5,3 % en cubanos blancos.⁽⁵⁾ Sin embargo, no se ha mantenido un ritmo creciente de investigaciones en esta rama, ni se han incluido las principales áreas terapéuticas.

Algunos estudios de asociación entre el citocromo *CYP2D6* y la esquizofrenia han mostrado una baja frecuencia de pacientes metabolizadores lentos en comparación con las frecuencias reportadas en las poblaciones de origen, tales resultados se obtuvieron en muestras de pacientes daneses, españoles y alemanes.^(6,7,8) La plausibilidad biológica de la baja frecuencia de metabolizadores lentos en pacientes con esquizofrenia está sustentada en la implicación de la enzima *CYP2D6* en el metabolismo cerebral de un sustrato neuroactivo que pueda contribuir a la vulnerabilidad y la severidad clínica.

Estudios *in vitro* demuestran su participación en la biotransformación de tiramina (4-hidroxi-feniletilamina: producto de la descarboxilación de la

tirosina) a dopamina⁽⁹⁾ y en la regeneración de la serotonina a partir de la 5 metoxitriptamina. *Ozdemir* y otros plantearon que los metabolizadores lentos podían presentar bajos niveles de serotonina, pero altos de dopamina en la glándula pituitaria.⁽¹⁰⁾

Resulta interesante que las alteraciones en los receptores o en los transportadores de serotonina en el cerebro causan un tono hiposerotoninérgico que predispone a la ansiedad o al estrés y a diferentes grados de impulsividad. De ahí que la implicación que tiene la enzima en la delineación de los rasgos de la personalidad esté mediada por su influencia en la vía de la serotonina.⁽⁹⁾ La baja representación de metabolizadores lentos para esta enzima no siempre se ha replicado en otras poblaciones,^(11,12) los que suponen resultados contradictorios. Es importante señalar que no hay homología en todos los diseños de estudios a los que hacemos referencia: difieren en los alelos nulos incluidos (en función de los descritos en el momento en que se realizaron las investigaciones) y en la manera de seleccionar a los controles. Por lo que con el objetivo de aportar nuevas evidencias, nos propusimos evaluar la asociación entre las variantes no funcionales del gen *CYP2D6* con la esquizofrenia en pacientes cubanos. Constituye la primera investigación de este biomarcador farmacogenético enfocada en la psiquiatría en nuestro país.

Métodos

Se realizó un estudio de casos y controles. El universo de estudio de los casos lo constituyeron 403 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia según en DSM-IV, ingresados en el Hospital Psiquiátrico de La Habana, en el período de julio 2013 hasta mayo 2014. Mediante un muestreo aleatorio simple se seleccionaron 220 pacientes. Finalmente la muestra de los casos quedó conformada por 212 pacientes, previo consentimiento informado de los pacientes o familiares; en ocho casos la calidad y cantidad de la muestra de ADN no cumplieron los requisitos técnicos para los estudios de biología molecular.

El universo de estudio de los controles lo constituyeron 400 voluntarios sanos. A través del interrogatorio se exploraron antecedentes patológicos personales y hábitos tóxicos. Se les realizó un examen físico general y por aparatos. Se seleccionaron 326 individuos que de manera consecutiva cumplieron los siguientes criterios: dieron su consentimiento para participar en la

investigación, no antecedentes familiares de primer o segundo grado de esquizofrenia.

La disponibilidad de reactivos para los estudios de laboratorios permitía la inclusión de 550 individuos (casos o controles). La muestra seleccionada permitió una proporción de controles/casos de 1,5.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

Estudio molecular

Las muestras de ADN de los casos y controles incluidos en el estudio fueron analizadas en el Centro de Investigación Clínica del Área de Salud de Badajoz (CICAB), Universidad de Extremadura, Hospital Universitario Infanta Cristina, España, donde se realizó la determinación del genotipo *CYP2D6*.

El ADN se obtuvo a partir de una muestra de 10 mL de sangre periférica, usando como anticoagulante EDTA (56 mg/mL). La extracción y purificación fueron realizadas por el método de precipitación salina, descrito por Miller en 1988.⁽¹³⁾

La identificación de los alelos se realizó mediante la detección de uno o más polimorfismos de simple nucleótidos (SNP) claves de cada alelo, a través de reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas, en tiempo real (PCR-RT), basado en los ensayos TaqMan® en el sistema Fast 7300 PCR-RT (Applied Biosystems, CA, USA), comercialmente disponibles (Tabla 1). La variante alélica wt (del inglés *wild type*: alelo salvaje) fue asignada cuando ningún otro alelo analizado era detectado.

Tabla 1 - Detalle de los ensayos utilizados para la determinación alélica del *CYP2D6*

Alelo	SNP clave	ID ensayo
<i>CYP2D6</i> *3	2549delA	C_32407232_50
<i>CYP2D6</i> *4	1864G>A	C_27102431_BO
<i>CYP2D6</i> *5	Deleción de gen	Hs00010001_cn1
<i>CYP2D6</i> *6	1707T>del	C_32407243_20

ID: identificación

Análisis estadístico

Las frecuencias génicas fueron calculadas a partir de los genotipos observados. Para definir si las frecuencias genotípicas y génicas de los controles se encontraban

en equilibrio génico de Hardy-Weinberg (HW) se calculó el Ji cuadrado (χ^2) y la prueba exacta de Fisher. Se aplicó el *test* de diferencia de proporciones para la comparación de las frecuencias alélicas. El nivel de significación estadístico utilizado fue de $\alpha = 0,05$. Se utilizó el *software* GENEPOP 4.4 para Windows / Linux / Mac OsX (2015) que implementa diferentes métodos tradicionales de análisis de genética poblacional.

La capacidad metabólica/genotipo (fenotipo predictivo) fue definido: ML: dos alelos inactivos; MN: uno o dos genes activos.

Resultados

Las frecuencias de los alelos *CYP2D6* con actividad enzimática nula fueron similares entre los casos y los controles; no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2). De igual modo se comprobó que tanto los casos ($\chi^2 = 2,34085$; $p = 0,3175$) como los controles ($\chi^2 = 1,48091$, $p = 0,476898$) se encontraban en equilibrio de HW.

Tabla 2 - Frecuencias alélicas en casos y controles

Alelos <i>CYP2D6</i>	Casos n = 212	Controles n = 326	p**
*3	0,0047	0,0015	0,5654
*4	0,1179	0,1350	0,5791
*5	0,0448	0,0276	0,1237
*6	0,0047	0,0077	0,7103

**Prueba de comparación (diferencia) de proporciones para dos poblaciones independientes.

Dentro de los alelos no funcionales o nulos, el más frecuente en esta investigación fue el *CYP2D6**4, seguido por el *CYP2D6**5, tal como sucede en la mayoría de las poblaciones.

Las frecuencias genotípicas a partir de la combinación de los alelos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3 - Distribución de los genotipos CYP2D6 en casos y controles

Fenotipo predictivo (número de genes activos)	Genotipos <i>CYP2D6</i>	Casos n = 212		Controles n = 326	
		n	%	n	%
ML (0)	*6/*6	0	0,00	0	0,00
	*5/*5	1	0,47	0	0,00
	*4/*4	1	0,47	5	1,53
	*3/*3	0	0,00	0	0,00
	*6/*5	0	0,00	0	0,00
	*6/*4	1	0,47	0	0,00
	*6/*3	0	0,00	0	0,00
	*5/*4	1	0,47	1	0,31
	*5/*3	0	0,00	0	0,00
	*4/*3	0	0,00	0	0,00
		4	1,88	6	1,84
MN (1 o 2)	wt/*6	1	0,47	5	1,53
	wt/*5	16	7,55	17	5,21
	wt/*4	46	21,70	77	23,62
	wt/*3	2	0,94	1	0,31
	wt/wt	143	67,46	220	67,47
		208	98,12	320	98,16

No se detectó una diferencia estadísticamente significativa de ML entre los pacientes con esquizofrenia y los voluntarios sanos (1,88 vs. 1,84) ($\chi^2 = 2,71980$, $p = 0,256686$).

Discusión

El gen *CYP2D6* es muy polimórfico; se han identificado al menos 110 variantes alélicas.⁽¹⁴⁾ Nuestros resultados confirman que en la categoría de alelos no funcionales o nulos, el *CYP2D6*4* es el más representativo, con una frecuencia alélica igual a 0,1179 en los pacientes y de 0,1350 en los controles. La prevalencia de este alelo varía desde 0 hasta 0,21 entre los amerindios, mestizos y eurodescendientes en América Latina.⁽¹⁾

Entre los caucásicos, la frecuencia de este alelo oscila entre 0,18 hasta llegar en las poblaciones escandinavas a 0,26.⁽¹⁵⁾ En el caso de Cuba, una publicación en voluntarios sanos reportó una frecuencia similar entre cubanos blancos y mestizos, 0,146 y 0,143, respectivamente.⁽⁵⁾ La variante *CYP2D6*4* implica un cambio de guanina por adenina en la posición 1864, lo que provoca un defecto en el procesamiento del ARN al generar un codón de terminación que produce la síntesis de una proteína inactiva que contiene 181 aminoácidos en lugar de los 457 que codifica el alelo salvaje.⁽¹⁶⁾

En el caso del alelo *CYP2D6**5 se ha reportado con una frecuencia que varía entre 0 y 0,046 para las poblaciones iberoamericanas en general. La prevalencia más alta en esta región se encuentra en la población mestiza de Colombia, con una frecuencia de 0,077.⁽¹⁷⁾ Al comparar la frecuencia de este alelo con las reportadas para otras regiones diferentes a Iberoamérica, resultó más alta que la descrita en caucásicos (0,028) y menor que la frecuencia afroamericana (0,064).⁽¹⁾

El alelo *CYP2D6**3 es otro de los no funcionales, presenta una delección de un par de bases que interrumpe el marco de lectura y provoca la terminación prematura de la proteína. La frecuencia para esta variante alélica fue similar a la descrita para la región de las Américas (0,006); resultó más baja que la frecuencia caucásica, que incluye individuos europeos y norteamericanos (0,013), y más alta que la reportada para los afroamericanos (0,0027).⁽¹⁾

Al igual que ocurre en todas las poblaciones, en este grupo de alelos no funcionales, *CYP2D6**6 tuvo la frecuencia más baja en ambos grupos. Esta variante es resultado de una delección en el exón 3, que provoca el corrimiento del marco de lectura, generando un codón de terminación. Con relación a este alelo se reporta una frecuencia de 0,002 en individuos afroamericanos y 0,01 en caucásicos.⁽¹⁾

En un estudio similar en pacientes con esquizofrenia, de la región sur de Brasil, la frecuencia de estos alelos con actividad nula, coincidió con el mismo orden de frecuencia analizada en este estudio, en primer lugar, el alelo *4, con 0,0941, seguido del *5, con 0,0215. En la investigación a la que se hace referencia, las frecuencias de los alelos fueron similares entre los pacientes con esquizofrenia y los voluntarios sanos.⁽¹¹⁾ De igual modo ocurrió en un segundo estudio realizado en pacientes esquizofrénicos españoles y voluntarios sanos.⁽¹⁸⁾

Como resultado de la combinación de estos alelos, la distribución mundial de los ML varía marcadamente. En las poblaciones mestizas, afrodescendientes y eurodescendientes de América Latina, las frecuencias de ML varían entre 1,0-6,0 %. Específicamente, en el caso de Cuba, las reportadas con anterioridad al presente estudio oscilaban entre 3,9-5,3 %.⁽⁵⁾ Llama la atención que en esta investigación la frecuencia de ML en ambos grupos es inferior a los resultados previos, y al no mostrar diferencias no supone un factor de protección o predisposición a la esquizofrenia.

Es importante señalar que, a pesar de que los controles son individuos cubanos y muestran la manera en que se distribuyen los alelos de este *locus* en la población,

no pertenecen a la población fuente de los casos. Esto constituye una de las limitaciones del diseño y pudiera ser una posible explicación a que no se obtuvieran diferencias significativas en las distribuciones alélicas o genotípicas entre pacientes y controles. Tal como se explicó anteriormente, el grupo control estuvo conformado por estudiantes y profesores universitarios.

Aunque la relación entre la esquizofrenia y los genotipos relacionados con *CYP2D6* no son concluyentes, la caracterización de los polimorfismos de este gen en esta enfermedad es muy importante, tanto en la búsqueda de genes candidatos funcionales que se han seleccionado a partir de evidencias neurofarmacológicas, como para dilucidar su papel en la aparición de reacciones adversas, debido a su participación en el metabolismo de los fármacos antipsicóticos.

En este estudio, el fenotipo predictivo metabolizador lento del gen *CYP2D6* no resultó un factor de predisposición a la esquizofrenia. No obstante, se deben diseñar investigaciones en el campo de la farmacogenética, con muestreos aleatorizados, que permitan extrapolar los resultados a la población, para estimar la frecuencia de metabolizadores lentos en la población cubana, sin que medien sesgos de selección en los controles.

Referencias bibliográficas

1. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T. Prediction of *CYP2D6* phenotype from genotype across world populations. *Genetics in Medicine*. 2017;19(1):69-76.
2. Peñas-Lledo EM LA. *CYP2D6* variation, behaviour and psychopathology: implications for pharmacogenomics-guided clinical trials. *British journal of clinical pharmacology*. 2014;77(4):673-83.
3. Chen J CF, Liu L, Wang L, Chen X. Genetic studies of schizophrenia: an update. *Neurosci Bull*. 2015;31(1):87-98.
4. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P-450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(4):688-700.
5. Llerena A, Ramírez R, González I, Álvarez M, Peñas-Lledó E, et al. *CYP2D6* genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *The pharmacogenomics journal*. 2010;12(2):176-83.
6. Dahl AA, Løwert A, Asserson S, Bjarking L, Berglund J, Kristensen F, et al. Hydroxylation polymorphism of debrisoquine hydroxylase (*CYP2D6*) in patients with schizophrenia in Norway and Denmark. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 1998;13(7):509-11.

7. Brockmoller J KJ, Schmider J, Walter S, Sachse C, Muller-Oerlinghausen B, et al. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(4):438-52.
8. Llerena A, Dorado P, Penas-Lledo EM, Caceres MC, De la Rubia A. Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients. *The pharmacogenomics journal.* 2007;7(6):408-10.
9. Niwa T, Shizuku M, Yamano K. Effect of genetic polymorphism on the inhibition of dopamine formation from p-tyramine catalyzed by brain cytochrome P-450 2D6. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2017;620:23-7.
10. Ozdemir V, Bertilsson L, Miura J, Carpenter E, Reist C, Harper P, et al. CYP2D6 genotype in relation to perphenazine concentration and pituitary pharmacodynamic tissue sensitivity in Asians: CYP2D6-serotonin-dopamine crosstalk revisited. *Pharmacogenetics and genomics.* 2007;17(5):339-47.
11. Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Gesteira A, Barros F, et al. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics.* 2009;10(9):1457-66.
12. Roblejo Balbuena H. Polimorfismos del gen CYP2D6 y su relación con la esquizofrenia. *Revista del Hospital Psiquiátrico de La Habana.* 2016;13(1).
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research.* 1988;16(3):1215-9.
14. Nomenclature CDA. CYP2D6 allele nomenclature. Cytochrome P-450 Allele Nomencl. Database. *Hum Genet.* 2015 [acceso: 17/01/2019]. Disponible en: https://www.pharmvar.org/index_original
15. Llerena Aea. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2014;10(11):1569-83.
16. Don CG, Smiesko M. Microsecond MD simulations of human CYP2D6 wild-type and five allelic variants reveal mechanistic insights on the function. 2018;13(8):e0202534. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202534>
17. Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenetics and genomics.* 2007;17(2):93-101.
18. Álvarez S, Mas S, Gasso P, Bernardo M, Parellada E, Lafuente A. Lack of association between schizophrenia and polymorphisms in dopamine metabolism and transport genes. *Fundamental & clinical pharmacology.* 2010;24(6):741-7.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Hilda Roblejo Balbuena: Diseño de la investigación, análisis de datos y escritura del manuscrito, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Beatriz Marcheco Teruel: Diseño de la investigación, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Giselle Monzón Benítez: Diseño de la investigación, búsqueda activa de pacientes, obtención y análisis de datos primarios, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Lilia C. Marín Padrón: Búsqueda activa de pacientes, obtención y análisis de datos primarios, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Antonio A. Esperón Álvarez: Diseño del procedimiento analítico y obtención de datos primarios, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Teresa Collazo Mesa: Diseño del procedimiento analítico y obtención de datos primarios, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.

Adrián Llerena Ruíz: Diseño de la investigación, análisis de datos y escritura del manuscrito, revisión y aprobación de la versión final del manuscrito.