UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

VARIABILIDAD INTERÉTNICA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *UGT1A4* Y *CYP2C9 IVS8-109 A>T* EN LAS POBLACIONES ESPAÑOLA E IBEROAMERICANAS

ALICIA GALLEGO AGUILERA

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

2015

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

VARIABILIDAD INTERÉTNICA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *UGT1A4* Y *CYP2C9 IVS8-109 A>T* EN LAS POBLACIONES ESPAÑOLA E IBEROAMERICANAS

ALICIA GALLEGO AGUILERA

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

CONFORMIDAD DEL/LOS DIRECTOR/RES:

Adrián Llerena Ruiz, Profesor Titular Vinculado del Dpto. de Terapéutica Médico-Quirúrgica, Área de Farmacología, de la Universidad de Extremadura, Hospital Universitario, CHUB. CICAB Centro de Investigación Clínica.

Pedro Dorado Hernández, Profesor Ayudante Doctor del Dpto. de Terapéutica Médico-Quirúrgica, Área de Farmacología, de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAMOS QUE: El trabajo de investigación titulado "***Variabilidad interétnica de los polimorfismos genéticos de UGT1A4 y CYP2C9 IVS8-109 A>T en las poblaciones española e Iberoamericanas***" que presenta ***Alicia Gallego Aguilera*** ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura y que cumple los requisitos para optar al grado de Doctor.

Fdo: Adrián LLerena Ruíz **Fdo: Pedro Dorado Hernández**

2015

ÍNDICE

RESUMEN ..... **- 1 -**
ABSTRACT ..... **- 3 -**

I. INTRODUCCIÓN ..... **- 5 -**
1. VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS ..... - 6 -
1.1. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase I: CYP450 ..... - 8 -
1.1.1. Características generales de los citocromos P450 ..... - 8 -
1.1.2. Polimorfismos metabólicos de los citocromos P450 ..... - 10 -
1.1.3. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450 ..... - 11 -
1.2. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase II: UGTs ..... - 13 -
1.2.1. Características generales de las UDP-glucuronosiltransferasas ..... - 13 -
1.2.2. Localización de las enzimas UGTs ..... - 15 -
1.2.3. Clasificación de genes que codifican para UGT1As ..... - 16 -
1.2.4. Polimorfismo metabólico de UGT1As ..... - 18 -
2. CITOCROMO P450 2C9 (CYP2C9) ..... - 19 -
2.1. Variabilidad del fenotipo metabólico CYP2C9 ..... - 21 -
2.2. Polimorfismo genético del *CYP2C9* ..... - 24 -
2.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético del *CYP2C9* ..... - 28 -
2.4. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9 con losartán ..... - 32 -
2.5. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *CYP2C9* ..... - 34 -
3. UDP-GLUCURONOSILTRANSFERASA 1A4 (UGT1A4) ..... - 37 -
3.1. Variabilidad del fenotipo metabólico UGT1A4 ..... - 37 -
3.2. Polimorfismo genético de *UGT1A4* ..... - 38 -
3.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* ..... - 40 -
3.4. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *UGT1A4* ..... - 41 -

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS ..... **- 43 -**
1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS ..... - 44 -
2. OBJETIVO GENERAL ..... - 47 -
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... - 47 -

III. MATERIAL Y MÉTODOS ..... **- 48 -**
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO ..... - 49 -
2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN ..... - 53 -
2.1. Examen Clínico ..... - 53 -
2.2. Criterios de inclusión y exclusión ..... - 53 -
2.3. Protocolos de estudio ..... - 54 -
3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS ..... - 55 -
3.1. Análisis del SNP *IVS8-109 A>T* del *CYP2C9* ..... - 55 -
3.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4* ..... - 56 -
4. METODOLOGÍA ..... - 57 -
4.1. Análisis del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* ..... - 57 -
4.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4* ..... - 60 -
*4.2.1. Detección de los alelos UGT1A4*1b* y **2* ..... - 60 -
*4.2.2. Detección del alelo UGT1A4*3* ..... - 61 -
4.3. Análisis de losartán y su metabolito en orina. ..... - 63 -

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS ..... - 64 -
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS..... - 65 -

IV. RESULTADOS ..... - 67 -
1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP IVS8-109 A>T DEL GEN CYP2C9 EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA ..... - 68 -
1.1. Estudio I.1.Desarrollo de un método para la determinación SNP *CYP2C9 IVS8 109 A>T*...- 68 -
1.2. Estudio I.2.Determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población española y diferencias interétnicas..... - 71 -
1.2.1. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en una población española* ..... - 71 -
1.2.2. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en una población ecuatoriana*..... - 72 -
1.2.3. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-caucásica*..... - 72 -
1.2.4. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-mestiza*..... - 73 -
1.2.5. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en otras poblaciones* ..... - 74 -
1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos..... - 76 -
2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE UGT1A4 EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO ..... - 77 -
2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas ..... - 77 -
2.1.1. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población española ..... - 77 -
2.1.2. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población mexicana-mestiza..... - 78 -
2.1.3. Frecuencias alélicas del gen UGT1A4 en otras poblaciones..... - 80 -

V. DISCUSIÓN ..... - 82 -
1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP IVS8-109 A>T DEL GEN CYP2C9 EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA ..... - 83 -
1.1. Estudio I.1. Desarrollo de un método para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*... - 83 -
1.2. Estudio I.2. Determinación del SNP *CYP2C9IVS8-109 A>T* en la población española y diferencias interétnicas..... - 83 -
1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos..... - 84 -
2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE UGT1A4 EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO ..... - 87 -
2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas ..... - 87 -

VI. CONCLUSIONES ..... - 92 -
1. CONCLUSIONES GENERALES..... - 93 -
2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS..... - 93 -

VII. BIBLIOGRAFÍA..... - 95 -

VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN ..... - 128 -
1. AGRADECIMIENTOS ..... - 129 -
2. FINANCIACIÓN..... - 130 -

IX. ANEXOS ..... - 131 -
1. ÍNDICE DE TABLAS ..... - 132 -
2. ÍNDICE DE FIGURAS..... - 134 -
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... - 135 -

X. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL..... - 138 -

RESUMEN

Introducción: El metabolismo es uno de los procesos farmacocinéticos más determinantes en la eliminación de las concentraciones plasmáticas de fármacos y/o metabolitos, estando este proceso mediado por diferentes enzimas, algunas de las cuales, presentan un polimorfismo genético como es el caso de las enzimas CYP2C9 (enzima de Fase I) y UGT1A4 (enzima de Fase II), las que a su vez están implicadas en la biotrasnformación de gran número de fármacos con uso en la práctica clínica habitual, como antiinflamatorios no esteroideos, anticoagulantes y antidiabéticos orales, antihipertensivos como losartán, así como diferentes antiepilépticos como fenitoina o lamotrigina.

Las frecuencias de las variantes alélicas del *CYP2C9* han sido previamente descritas en la población española, no así las frecuencias de *UGT1A4.* Sin embargo, recientemente se ha descrito un nuevo polimorfismo intrónico (*IVS8-109A>T*) en el gen *CYP2C9,* cuya presencia, parece ser que influye en la actividad de la enzima, habiendo sido estudiado *in vivo*, hasta la fecha, en un estudio con dos poblaciones diferentes y obteniéndose resultados discrepantes.

Objetivo: El objetivo principal de la presente tesis fue determinar si existe variabilidad del gen *UGT1A4* y del SNP *IVS8-109A>T* del *CYP2C9* en la población española en comparación con otras poblaciones iberoamericanas (México, Ecuador y Cuba), así como verificar la potencial influencia de la variante *IVS8-109A>T* del *CYP2C9* sobre el metabolismo de losartán en voluntarios sanos.

Materiales y Métodos: Se determinó la frecuencia del SNP *IVS8-109A>T* mediante un nuevo método de PCR-RFLP en diferentes poblaciones de voluntarios sanos con diferente origen: 92 españoles, 187 ecuatorianos, 105 cubanos de origen caucásico y 108 cubanos mestizos. Estas frecuencias se compararon con las frecuencias encontradas en otras poblaciones. Por otro lado, se evaluó la potencial influencia de este SNP sobre el índice metabólico de losartán/E-3174 en 161 voluntarios sanos. Con respecto al gen *UGT1A4* se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes *UGT1A4*1b*, **2* y **3* en una población de 318 voluntarios sanos españoles y 248 voluntarios sanos mexicanos-mestizos para su comparación entre sí y con otras poblaciones estudiadas previamente.

Resultados y Discusión: La frecuencia del alelo *CYP2C9 IVS8-109 T* en la población española fue similar a la de la población cubana con origen caucásico (0.38 y 0.32, respectivamente), mayor que la encontrada en voluntarios sanos ecuatorianos (0.21; $p < 0.05$) y menor a la de voluntarios sanos cubanos mestizo (0.48; $p<0.05$). La presencia del alelo *IVS8-109T* se vio asociada con un incremento de la actividad de CYP2C9 en individuos *CYP2C9*1/*1* con genotipo homocigoto mutante para este SNP (*IVS8-109T/T*). Estos individuos presentaron un ratio metabólico urinario losartán/E-3174 menor (2.3±3.7; $p=0.021$) que individuos con genotipo *IVS8-109A/A* (4.8±5.8; $p=0.021$). Este resultado es contradictorio al obtenido previamente en voluntarios sanos suecos (Hatta y cols., 2012).

Por otro lado, las frecuencias de las variantes alélicas *UGT1A4*1b*, **2* y **3* en la población española fueron 0.17, 0.07 y 0.09, respectivamente, mientras que en la población mexicana mestiza, las frecuencias alélicas encontradas fueron 0.08, 0.03 y 0.13, respectivamente. Se pudo observar que la frecuencia del alelo *UGT1A4*2* fue dos veces más alta en la población española que en la de mexicanos-mestizos, a diferencia del alelo *UGT1A4*3* que fue menor ($p<0.05$) en españoles que en mexicanos-mestizos. Solo se encontraron 4 haplotipos iguales que fueron observados en más del 5% en ambas poblaciones, pero con diferentes frecuencias. En la comparación con otras poblaciones, el alelo *UGT1A4*1b* es más frecuente en europeos (0.18) y muy raro en asiáticos (0.01) y africanos (0.04). La frecuencia de los alelos *UGT1A4*2* y **3* en la población española es similar a otras poblaciones caucásicas, mientras que la frecuencia del alelo *UGT1A4*2* y **3* en la población española es más alta y más baja que en poblaciones asiáticas, respectivamente.

Conclusiones: Los resultados de la presente Tesis muestran la existencia de una variabilidad interétnica en la frecuencia del SNP *IVS8-109 A>T CYP2C9* y de las variantes alélicas y genotípicas del *UGT1A4* entre la población española y otras poblaciones iberoamericanas. Además, se ha podido demostrar la potencial influencia del SNP *IVS8-109 A>T* en el aumento de la actividad hidroxiladora de CYP2C9.

ABSTRACT

Introduction: Metabolism is one of the most determining pharmacokinetic processes in the elimination of the plasma concentrations of drugs and/or metabolites, this process is mediated by different enzymes, some of which still exhibit a genetic polymorphisms such as CYP2C9 (enzyme Phase I) and UGT1A4 (enzyme Phase II), which in turn are involved in the biotransformation of a large number of drugs used in clinical practice, such as NSAIDs, anticoagulants and oral antidiabetics, antihypertensives such as losartan as well as different antiepileptics like phenytoin or lamotrigine.

The frequencies of allelic variants *CYP2C9* have been previously described in the Spanish population, not frequencies of *UGT1A4*. However, it has recently been described a new intronic polymorphism (*IVS8-109A>T*) in the gene *CYP2C9* whose presence appears to influence the activity of the enzyme, it has been studied *in vivo*, to date, a study with two different populations and giving discrepant results.

Objective: The main objective of this thesis is to determine whether there is variability of *UGT1A4* gene and *CYP2C9 SNP IVS8-109A>T* in the Spanish population compared to other Latin American populations (Mexico, Ecuador, Cuba) and checking the potential influence of the variant *CYP2C9 IVS8-109A>T* on the metabolism of losartan in healthy volunteers.

Materials and Methods: The frequency of SNP *IVS8-109A>T* was determined by a new method of PCR-RFLP in different populations of healthy volunteers with different backgrounds: 92 Spaniards, 87 Ecuadorians, 105 Caucasians Cubans, and 108 Mestizos Cubans. These frequencies were compared with the frequencies found in other populations. Furthermore, the potential influence of this SNP on the metabolic rate of losartan/E-3174 in 161 healthy volunteers was evaluated. Regarding the *UGT1A4* gene, the allelics and genotypics frequencies of the variants *UGT1A4*1b*, **2*, and **3* were determined in a population of 318 healthy volunteers and 248 healthy volunteers, who were Mestizos Mexicans, for their comparison with each other and with other populations previously studied.

Results and Discussion: The frequency of allele *CYP2C9 IVS8-109A>T* in the Spanish population was similar to the Caucasian Cuban population (0.38 and 0.32, respectively), higher than that found in Ecuadorian healthy volunteers (0.21; $p<0.05$) and lower than in Mestizan Cubans healthy volunteers (0.48; $p<0.05$). The presence of allele *IVS8-109T* was associated with an increased activity CYP2C9 in individuals *CYP2C9*1/*1* with mutant homozygous genotype for this SNP (*IVS8-109T/T*). These individuals had a urinary metabolic ratio losartan/E-3174 lower (2.3±3.7; $p=0.021$) than individuals with genotype *IVS8-109A/A* (4.8±5.8; $p=0.021$). This result is contradictory to the one previously obtained in healthy volunteers Swedish (Hatta et al., 2012).

On the other hand, the frequencies of allelics variants *UGT1A4*1b*, **2* y **3* in the Spanish population were 0.17 and 0.09, respectively, while the Mestizo Mexican population allelics frequencies found were 0.08, 0.03 and 0.13 respectively. It was observed that the frequency of allele *UGT1A4*2* was twice as high in the Spanish population than in the Mestizos Mexicans, unlike the allele *UGT1A4*3* which was lower ($p<0.05$) in Spanish than in Mestizos-Mexicans. Only four equal haplotypes were observed in more than 5% in both populations, but with different frequencies were found. In comparison with other populations, the allele *UGT1A4*1b* is more common in Europeans (0.18) and very rare in Asians (0.01) and Africans (0.04). The frequency of alleles *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* in the Spanish population is as similar as other Caucasians populations, while the frequency of allele *UGT1A4*2* and **3* in the Spanish population is higher and lower than in Asians populations, respectively.

Conclusions: The results of this Thesis show the existence of an interethnic variability in the frequency of SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* and of the allelics and genotypics variants of *UGT1A4* among the Spanish population and other Latin American populations. Furthermore, it has been demonstrated that the potential influence of SNP *IVS8-109A>T* has resulted in an increase in hydroxylation activity of CYP2C9.

I. INTRODUCCIÓN

1. VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS ..... - 6 -
1.1. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase I: CYP450 ..... - 8 -
1.1.1. Características generales de los citocromos P450 ..... - 8 -
1.1.2. Polimorfismos metabólicos de los citocromos P450 ..... - 10 -
1.1.3. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450 ..... - 11 -
1.2. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase II: UGTs ..... - 13 -
1.2.1. Características generales de las UDP-glucuronosiltransferasas. ..... - 13 -
1.2.2. Localización de las enzimas UGTs ..... - 15 -
1.2.3. Clasificación de genes que codifican para UGT1As ..... - 16 -
1.2.4. Polimorfismo metabólico de UGT1As. ..... - 18 -
2. CITOCROMO P450 2C9 (CYP2C9) ..... - 19 -
2.1. Variabilidad del fenotipo metabólico CYP2C9 ..... - 21 -
2.2. Polimorfismo genético del *CYP2C9* ..... - 24 -
2.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético del *CYP2C9* ..... - 28 -
2.4. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9 con losartán ..... - 32 -
2.5. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *CYP2C9* ..... - 34 -
3. UDP-GLUCURONOSILTRANSFERASA 1A4 (UGT1A4) ..... - 37 -
3.1. Variabilidad del fenotipo metabólico UGT1A4 ..... - 37 -
3.2. Polimorfismo genético de *UGT1A4* ..... - 38 -
3.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* ..... - 40 -
3.4. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *UGT1A4* ..... - 41 -

1. VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS

Con frecuencia se observa en la práctica clínica diaria que pacientes tratados con la misma dosis de un fármaco presentan variabilidad en la respuesta terapéutica y en la aparición de efectos adversos. Esta variabilidad puede ser debida bien a factores farmacodinámicos o farmacocinéticos. Las diferencias individuales en los procesos de absorción, distribución, metabolismo o excreción pueden dar lugar a variabilidad en las concentraciones plasmáticas del fármaco y/o sus metabolitos. Entre los procesos farmacocinéticos, el metabolismo es uno de los determinantes en la eliminación y por tanto de las concentraciones plasmáticas de fármaco y/o metabolitos. Por otra parte, en muchos casos la biotransformación de los fármacos resulta esencial para que éstos cesen en su actividad biológica, siendo condicionante por tanto, de la variabilidad en el efecto farmacológico.

Las reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos se clasifican en dos tipos: reacciones de Fase I, aquellas que introducen o exponen un grupo funcional al fármaco original con el fin de aumentar la polaridad mediante procesos de oxidación, reducción o hidrólisis; y reacciones de Fase II, que son las que llevan a cabo una conjugación entre el fármaco o sus metabolitos con moléculas endógenas polares, principalmente el ácido glucurónico y sulfatos, para dar lugar a un producto más hidrosoluble (Flores, 2013). Estas reacciones son primordiales para la eliminación de numerosos fármacos y xenobióticos en general. Por tanto, la variabilidad en la actividad enzimática de este sistema se presenta como un factor determinante de las diferencias interindividuales observadas en la respuesta a fármacos (Brunton, 2012).

Dentro de las reacciones de oxidación de **Fase I**, que tienen lugar en la membrana del retículo endoplasmático del hepatocito, se encuentran las reacciones de hidroxilación mediadas por el complejo enzimático denominado citocromo P-450 (CYPs), que forman parte del sistema oxidativo de los microsomas hepáticos. Estas enzimas presentan como característica principal una alta

variabilidad genética que hace que sean responsables de las diferencias interindividuales observadas en la respuesta a numerosos fármacos, teniendo un papel importante en la eliminación de numerosos fármacos y xenobióticos (Relling y Giacomini, 2005; Wang y Chou, 2010; Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011).

Las reacciones de **Fase II** más habituales son las reacciones de conjugación catalizadas por enzimas transferasas, como glutation S-transferasas (GSTs), uridina difosfoglucuronosil transferasas (UGTs), tiopurina metiltransferasas (TMPT), sulfotransferasas (SULTs), y N-acetiltransferasas (NATs). Uno de los grupos de enzimas más relevantes de esta fase, en el metabolismo de fármacos, son las uridín-5´-difosfato (UDP) glucuronosiltransferasa (UGTs), una superfamilia de enzimas que en el proceso de conjugación realizan una glucuronización a partir de ácido glucurónico (Crettol y cols., 2010). Al igual que con las enzimas de Fase I, se ha podido demostrar la existencia de polimorfismos genéticos de UGTs con repercusión funcional, principalmente relacionados con cambios en los niveles de expresión o con el grado de actividad de estas enzimas (Guillemette, 2003), influyendo estos cambios en el aclaramiento de diferentes sustratos metabolizados por estas enzimas (Evans y Relling, 1999).

Las reacciones enzimáticas metabólicas de Fase II son frecuentemente precedidas de una reacción de Fase I, aunque esto no es un requisito imprescindible. Las enzimas de Fase II son muy eficaces en la polarización de fármacos a través de la conjugación con un sustrato polar que facilita la excreción biliar y renal de los mismos. En definitiva, el objetivo de estos procesos es transformar compuestos hidrofóbicos en derivados solubles para facilitar la detoxificación y excreción (Flores, 2013).

La **Farmacogenética** es la disciplina que estudia las bases genéticas implicadas en las variaciones en el metabolismo y en la respuesta a los fármacos (Vogel 1959; Pickar y Rubinow, 2001; Kalow, 2006). Está ampliamente aceptado que factores genéticos-ambientales pueden modificar la actividad de las isoenzimas del citocromo P-450 y por tanto ser la causa de la diferencia en la

respuesta terapéutica de los fármacos (Vesell, 1984; Pelkonen y Sotaniemi, 1987; Llerena y cols., 1996). La variabilidad genética en el metabolismo de fármacos se ve reflejada en cambios o diferencias en los parámetros farmacocinéticos como el aclaramiento, vida media o concentración plasmática máxima del fármaco en el organismo. Los conocimientos farmacogenéticos permiten ajustar la dosis basada en el genotipo de cada uno de los individuos, lo que podría ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento farmacológico, disminuiría el número de pacientes que sufren reacciones adversas y se reduciría el riesgo de morbilidad y mortalidad inducida por fármacos (Nebert, 1999; Ingelman-Sundberg y cols., 2007; Seering y Kirchheiner, 2008). El estudio de la información genética para predecir consecuencias del tratamiento farmacológico es lo que se conoce como **Famacogenómica** (Pickar y Rubinow, 2001), aunque los términos farmacogenética y farmacogenómica se usan indistintamente.

El polimorfismo genético de las enzimas implicadas en el metabolismo juegan un papel importante en esta variabilidad de la respuesta a fármacos, pero debe tenerse en cuenta que otros factores, como los ambientales, el metabolismo endógeno y las distintas fases en las que se desarrolla una enfermedad, también tienen una gran influencia sobre el metabolismo de fármacos (LLerena y cols., 1996). Por tanto, en un mismo individuo, el genotipo no siempre está correlacionado con el fenotipo metabólico.

1.1. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase I: CYP450

1.1.1. Características generales de los citocromos P450

Los citocromos P-450 (CYP) son una superfamilia de hemoproteínas que catalizan distintas reacciones de óxido-reducción. El nombre de citocromo P-450 se debe a que estas proteínas, cuando son reducidas en presencia de monóxido de carbono (CO), muestran un espectro de absorción en el rango visible que alcanza su máximo en 450 nm.

Se localizan a nivel celular en las membranas del retículo endoplasmático liso y en la mitocondria, en diferentes tejidos, principalmente en el hígado, aunque también se encuentran en glándulas como los testículos o las glándulas adrenales (Guengerich y cols., 1993).

El 90% de las oxidaciones hepáticas de fármacos en humanos son atribuibles a las enzimas CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 y CYP3A4 (Bertz y Granneman, 1997; Evans y Relling, 1999; Rendic, 2002).

Estas enzimas son monooxigenasas de función mixta y su actividad requiere un agente reductor (NADPH) y oxígeno molecular. En una reacción típica, una molécula de oxígeno es reducida por cada molécula de sustrato. Un átomo de oxígeno se une al producto y el otro se une a dos átomos de hidrógeno, formándose una molécula de agua (H_2O) (Rang y cols., 2012). En este proceso intervienen dos enzimas: la citocromo P-450-NADPH reductasa, que actúa como transportador de electrones y el citocromo P-450 que lleva a cabo la reacción directamente con el sustrato.

Filogenéticamente, estas enzimas se encuentran presentes desde bacterias hasta humanos, exhibiendo un elevado nivel de conservación estructural y funcional (Kalow, 1992). Para su clasificación, cada familia enzimática (designadas por números arábicos) se divide en subfamilias (designadas por letras), de tal manera que las secuencias de las proteínas que se incluyen dentro de una misma subfamilia deben ser idénticas en más del 55% de la composición de aminoácidos y en un 40%, para incluirlas dentro de la misma familia.

Las enzimas del citocromo P-450 están implicadas en la eliminación de xenobióticos (fármacos, carcinógenos, pesticidas, etc.) y en la degradación de sustancias endógenas producidas por el propio organismo (esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles A y D, alcaloides endógenos, etc.) (Kalow, 1992; Ingelman-Sundeberg, 2004). Se ha estimado que las enzimas CYP son responsables de aproximadamente el 75% del metabolismo de fármacos en fase I. En humanos, de los más de 50 CYP conocidos, los miembros de las familias CYP4-CYP51 son los que están involucrados en el metabolismo de sustratos endógenos, mientras que tan solo tres familias de enzimas (CYP1, CYP2

y CYP3) parecen tener una contribución relevante en el metabolismo de la mayoría de fármacos usados en clínica, así como también de diferentes xenobióticos (Wrighton y Stevens, 1992; González, 1992; Cholerton y cols., 1992; Hasler, 1999; Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Numerosas isoenzimas de estas familias presentan una gran variabilidad interindividual en su actividad catalítica, debido principalmente a influencias genéticas y ambientales.

1.1.2. Polimorfismos metabólicos de los citocromos P450

Polimorfismo (del griego poli=muchos; morfos=forma) genético se define como una secuencia del ADN (ácido desoxirribonucleico) con dos o más alelos, donde el alelo más común (denominado en inglés "wild type") aparece con una frecuencia mayor de 1% en la población y el alelo con frecuencia menor del 1% es interpretado como un "caso raro" o mutación. Cuando un gen presenta una secuencia que cumple con esta característica se define como un locus polimórfico (Kalow, 1992; Bertilsson, 1995).

Actualmente el genoma humano contiene 116 genes CYP de los cuales 57 son funcionales y el resto lo constituyen pseudogenes. Entre las familias 1-3 de CYP, hay 22 isoformas que muestran un alto grado de polimorfismo, al contrario, del bajo grado de polimorfismo que muestran CYPs pertenecientes a las familias CYP4-51. Las enzimas CYPs implicadas en el metabolismo de xenobióticos pueden dividirse en dos clases principales (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006):

- Clase I: Compuesta por las enzimas CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A4 sin un claro polimorfismo genético disfuncional y activas en el metabolismo de procarcinógenos.
- Clase II: Compuesta de CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6, altamente polimórficos e importantes en el metabolismo de fármacos, pero no de procarcinógenos.

Las reacciones metabólicas dependientes de una enzima bajo control monogénico, conducen a que los parámetros metabólicos, como son el aclaramiento total, índice de formación de metabolitos, vida media, concentraciones plasmáticas e índice metabólico, muestren una curva de distribución discontinua en una población (LLerena, 1988). Teóricamente, la distribución de fenotipos de un rasgo monogénico recesivo debería ser trimodal, es decir, una distribución para el genotipo homocigoto recesivo, otro para el heterocigoto y otro para el homocigoto dominante, dando lugar a tres curvas diferentes (LLerena, 1988).

Las razones que explicarían una distribución bimodal es que los heterocigotos y homocigotos dominantes no pueden ser separados funcionalmente por los métodos de fenotipación utilizados o porque no exista una distinción a nivel funcional entre ambos grupos.

1.1.3. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450

La actividad catalítica de una enzima CYP puede ser medida tanto *in vivo* como *in vitro.* Para la determinación *in vivo*, se realiza una prueba de fenotipación que consiste en determinar la capacidad de metabolización de un fármaco "test" en un tiempo determinado. Las características de un fármaco "test" ideal serían: i) debe ser metabolizado por la enzima CYP en estudio, ii) debe excretarse totalmente en un fluido biológico para que pueda ser medido, iii) debe ser seguro y iv) debe estar comercializado.

A partir de la administración a un individuo de una sola dosis de un fármaco-test, se determinan las concentraciones del fármaco y su metabolito, ya sea en plasma, orina, saliva o aire espirado (Nebert y cols., 1987; 1989; Fuhr y Rost, 1994; Streetman y cols., 2000; Vijverberg y cols., 2103). La relación entre la concentración de fármaco y la concentración de metabolito en plasma u orina, se realiza por el cálculo del índice metabólico (IM), que refleja la capacidad metabólica ("fenotipo metabólico") de la enzima en estudio (Jackson y cols., 1986) y puede definirse como:

$$IM = \frac{\textit{Concentración de la dosis excretada del fármaco}}{\textit{Concentración de la dosis excretada como metabolito.}}$$

La capacidad metabólica del sistema de enzimas CYP, la conversión metabólica y la tasa de excreción de fármacos, varía de unos individuos a otros dentro de la misma población.

Fue en los años '50 cuando esta disciplina comenzó a desarrollarse con más intensidad, con la observación de la excreción de isoniazida, la cual variaba ampliamente entre individuos (Bönicke y Reif, 1953). Esta variación se debía a la diferente capacidad individual de acetilación de isoniazida, de modo que aquellos individuos con una menor capacidad de acetilación son más propensos a sufrir toxicidad por este fármaco (Hughes, 1954). Más tarde, se reportaron estudios dónde se observaron diferencias interindividuales en la respuesta a diferentes fármacos como primaquina (Alving y cols., 1956) o succinilcolina (Kalow y Gunn, 1957).

Posteriormente, en 1960 es cuando se demuestra el control genético de la acetilación de la isoniazida, describiéndose la existencia de dos fenotipos metabólicos: acetiladores rápidos y lentos (Evans y cols., 1960). Años más tarde, es cuando se describe en un estudio, que algunos individuos participantes eran incapaces de metabolizar debrisoquina (Mahgoub y cols., 1977), identificándose dos fenotipos: metabolizadores lentos y rápidos (del inglés “poor metabolizer” PM y "extensive metabolizer": EM). En el mismo período, llevando a cabo estudios con esparteína, se identificaron los dos fenotipos metabólicos (Eichelbaum y cols., 1979a; 1979b). Después de estos descubrimientos, se demostró que el fenotipo metabolizador lento de ambos fármacos estaban causados por la deficiencia de la misma enzima (denominadas debrisoquina y esparteína hidroxilasa, respectivamente).

Este fenómeno se ha identificado por la presencia de una distribución bimodal en la población, donde una de las modas corresponde a individuos con una capacidad de metabolización disminuida, los denominados portadores del fenotipo metabolizador lento (PM) y la otra representa a los individuos que poseen un fenotipo metabolizador rápido (EM) (Mahgoub y cols., 1977; Evans y

cols., 1980; Kalow, 1992; Van der Weide y Steijns, 1999). Ambos términos parecen los más adecuados en español para definir los términos ingleses "poor" y "extensive metabolizer" (LLerena, 1988).

También se ha logrado describir entre los EMs para determinadas enzimas CYPs, la existencia de individuos con una capacidad de metabolización muy rápida, denominados ultrarrápidos ("ultrarapid metabolizer": UM) (Dahl y cols., 1995).

1.2. Variabilidad en el metabolismo de enzimas de Fase II: UGTs

La glucuronización es una de las principales rutas metabólicas de fase II para diferentes sustancias endógenas como esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, prostaglandinas y aminas (Ishii y cols., 2010a; 2010b; Radominska-Pandya y cols., 2010), así como para el 40-70% de todos los fármacos que son metabolizados por conjugación en fase II (Burchell y Coughtrie, 1989; Williams y cols., 2004; Ménard y cols., 2009; Reimers y cols., 2011). El objetivo final de este proceso es transformar compuestos hidrofóbicos en derivados solubles para facilitar la detoxificación y excreción (Radominska-Pandya y cols., 2010; Reimers y cols., 2011). Entre los numerosos fármacos que son metabolizados por glucuronización se encuentran algunos opioides, analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y anticonvulsionantes (Kuehli y cols., 2005).

1.2.1. Características generales de las UDP-glucuronosiltransferasas

Las enzimas UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) son enzimas de conjugación que catalizan la transferencia del ácido glucurónico (AGlc) de su forma activa uridina-5´difosfo-α-D-ácido glucurónico (UDP-AGlc) a sustratos lipofílicos que contienen grupos funcionales específicos los cuales sirven como aceptores nucleofílicos. El mecanismo de sustitución nucleofílica es comúnmente reconocido como un modo de acción para la mayoría de las reacciones de glucuronización. Sin embargo, la formación de glucurónidos no requiere la extracción de protones

esenciales para este mecanismo (Radominska-Pandya y cols., 2010). Las enzimas UGTs también pueden sintetizar glucurónidos biológicamente activos, algunos de los cuales, son tóxicos para el organismo (Radominska-Pandya y cols., 2010).

Las UGTs catalizan aproximadamente un 35% de las reacciones de fase II (Evans y Relling, 1999; Williams y cols., 2004; Miners y cols., 2004; Ménard y cols., 2009; Ishii y cols., 2010a; Bock, 2010). Estas enzimas reconocen numerosos grupos funcionales, incluyendo alcoholes aromáticos y alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas y radicales sulfidrilos libres. El resultado es la formación de un O-, N-, C- o un S-glucurónido (King y cols., 2000).

Estas enzimas se caracterizan por la capacidad de cada isoforma para aceptar, como sustratos, un gran número de estructuras tanto endógenas como exógenas (Radominska-Pandya y cols., 2010). También es la principal vía de eliminación de sustancias químicas exógenas de la dieta y el medio ambiente (Tukey y Strassburg, 2001).

Al igual que los CYPs, las UGTs conforman una superfamilia de enzimas. En mamíferos, esta superfamilia está formada por alrededor de 117 miembros, los cuales son divididos en 4 familias: UGT1, UGT2, UGT3 y UGT8 (Mackenzie y cols., 2005; Radominska-Pandya y cols., 2005). De estas cuatro familias, UGT1 y UGT2 metabolizan productos endógenos y exógenos glucuronidando a partir de ácido UDP-glucurónico. La UGT8 usa como sustrato para la glucuronización uridina 5´-difosfato (UDP) galactosa, que se transformará a ceramida galactosidada, fundamental para la síntesis de glicoesfingolípidos y cerebrósidos. La función de la familia UGT3 es aún desconocida, aunque algunos estudios demuestran que enzimas de esta familia catalizan la transferencia de N-acetilglucosamina desde UDP-N-acetilglucosamina a ácido ursodeoxicólico (3α, 7β-dihidroxi-5β-ácido colanoico) (Mulder, 1992).

De todas las familias, en mamíferos, UGT1 y UGT2 son las más estudiadas por su papel en el metabolismo de xenobióticos, entre los que se incluyen fármacos, tóxicos ambientales y carcinógenos entre otros. De ellas, 19 enzimas participan en el proceso de conjugación de fármacos

y endobióticos (Bock y cols., 1987), expresándose 10 en el hígado de humano adulto (> 1% del total de UGTs). De estas 10, cinco isoformas pertenecen a la familia UGT1 (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, y 1A9) y otras cinco isoformas pertenecen a la familia UGT2 (UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B15 y 2B17) (Izukawa y cols., 2009), donde UGT2B4 y 2B10 son las dos enzimas que presentan la mayor expresión en tejido hepático (Congiu y cols., 2002; Kaivosaari y cols., 2007; Ohno y Nakajin, 2009; Court, 2010).

Dentro de la familia UGT1 encontramos la subfamilia UGT1A, altamente conservada en su función y presente en varios vertebrados. En esta subfamilia, se han identificado 13 isoformas, de las cuales nueve (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 y 1A10) son clínicamente relevantes, por estar involucradas en el metabolismo de numerosos fármacos (Guillemete y cols., 2003; Nagar y Remmel, 2006).

La familia UGT2 está subdividida, en humanos, dentro de dos subfamilias: UGT2A y UGT2B, donde de la UGT2B, UGT2B7 y 2B15 están involucradas en el metabolismo de algunos fármacos importantes como la morfina, diclofenaco u oxacepam (Wells y cols., 2004).

En general, cada familia de las enzimas UGTs, comparte al menos un 50% de homología en su secuencia de ADNc y cada subfamilia el 60% (Mackenzie y cols., 2005; Ishii y cols., 2010b). La expresión y la función de estas enzimas esta modulada por diferentes mecanismos de fosforilación, glucosilación, homo/hetero-oligomerización y de asociación proteína-proteína con el citocromo P450 (Ishii y cols., 2010b). Por otra parte, se ha encontrado que la actividad de UGT en hígado de niños menores de 1 año es hasta 40 veces menor que en adultos (Miyagi y Collier, 2007).

1.2.2. Localización de las enzimas UGTs

En la célula están localizadas en la bicapa lipídica del retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias, junto a los CYPs. Tanto en animales como en humanos se han descrito en una gran variedad de órganos y tejidos, incluyendo el hígado y los tejidos extrahepáticos, como son los

pulmones, intestino delgado, colon y riñón (Knights y Miners, 2010), tejidos olfativos y cerebro (Heydel y cols., 2010; Ghosh y cols., 2013), útero, placenta y testículos (Reimers y cols., 2011). Las isoformas UGT expresadas principalmente en el hígado son UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 y 2B28 (Kosoglou y cols., 2005).

Estas enzimas son proteínas de membrana ancladas mediante su extremo C-terminal a la membrana interna del retículo endoplasmático (RE) e incluyendo su dominio catalítico en el interior de este orgánulo. El co-sustrato AGlc debe de pasar del citosol al lumen del RE para la reacción con UGT y los glucurónidos formados aquí, deben ser rápidamente traslocados al citosol. Los transportadores implicados en este proceso aún no han sido identificados, pero el paso del citosol a la bilis o a la sangre se hace a través de la membrana plasmática del hepatocito, mediante la participación de diferentes miembros de la familia de proteínas asociadas a la resistencia a multifármacos, MRP1, 2 y 3 (Keppler y cols., 1997; Hirohashi y cols., 1999) así como por transportadores de aniones orgánicos como OATP2, 4 y 8 (Cui y cols., 2001). Por tanto, su actividad está íntimamente relacionada con la interacción de los fosfolípidos de membrana (Benoit-Biancamano y cols., 2009; Ishii y cols., 2010b; Guillemette y cols., 2010; Magdalou y cols., 2010).

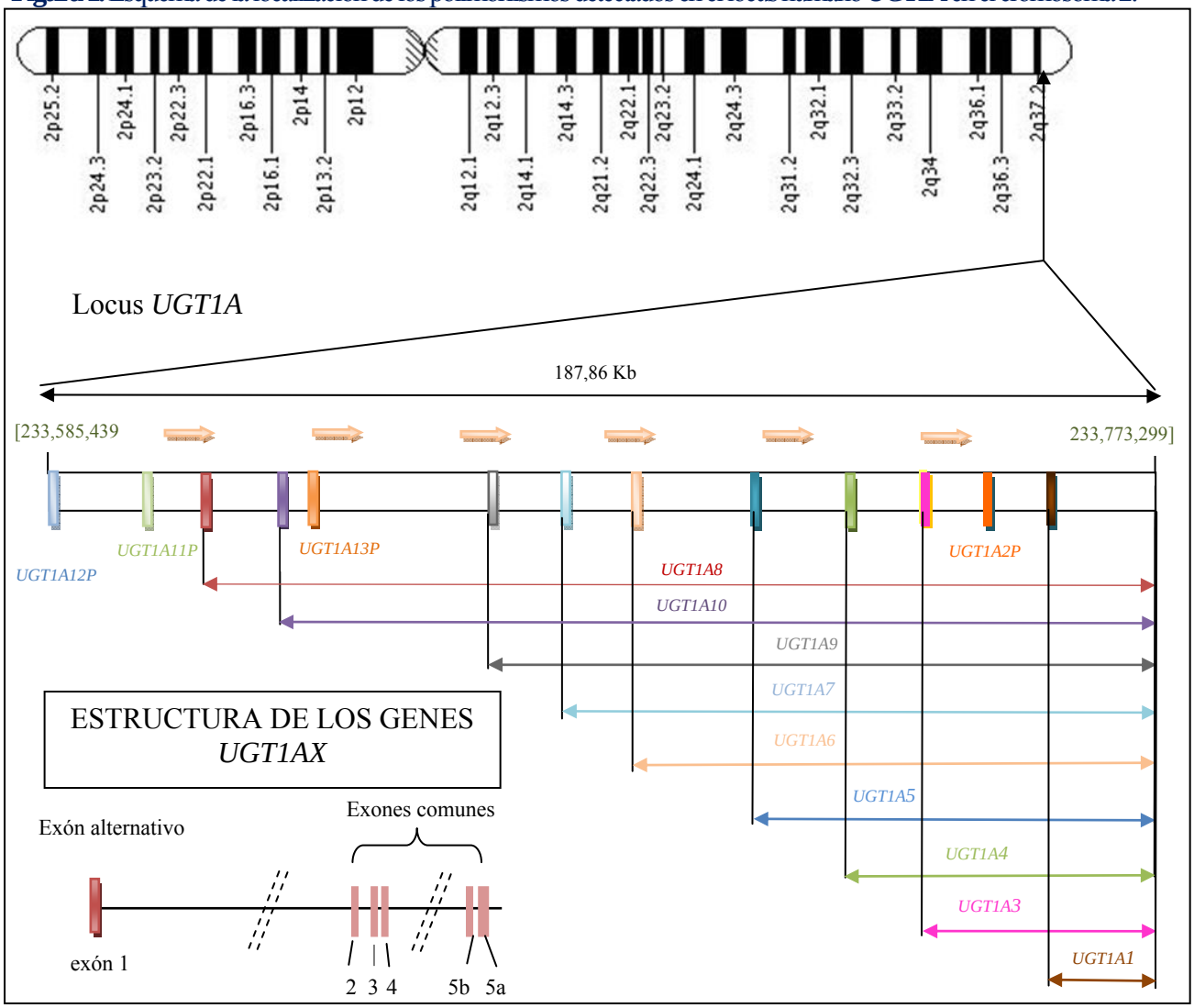
1.2.3. Clasificación de genes que codifican para UGT1As

Las UGTs en humanos están codificadas por una superfamilia de genes de gran tamaño. En concreto, las isoformas de la subfamilia UGT1A, están codificadas por el gen humano *UGT1A*, localizado en el locus 2q37 del cromosoma 2, ocupando una longitud de aproximadamente 188 kb. Este locus incluye trece exones alternativos únicos seguidos por cuatro exones comunes (Fig.1). Estructuralmente, cada uno de los genes que codifica para una isoforma, se compone de 5 exones (el exón variable 1 y los exones comunes 2-5). El exón 1, es distinto para cada isoforma y es el encargado de codificar el dominio de unión de la proteína al sustrato, proporcionando la especificidad de la proteína por este (Mackenzie y cols., 2005). Por lo tanto, nueve de ellos

codifican proteínas funcionales con el mismo grupo carboxilo-terminal pero diferentes dominios amino-terminal, mientras que otros cuatro son pseudogenes (*UGT1A2, 1A11*, *1A12* y *1A13)* (Ritter y cols., 1992; Gong y cols., 2001; Owens y cols., 2005; Guillemette y cols., 2010).

Los cuatro exones comunes para todas las isoformas, se encuentran en el extremo 3' del locus *UGT1* y codifican: para la región carboxi-terminal de la proteína implicada en la unión con el ácido glucurónico (UDP-AGlc), para el dominio transmembrana que permite su anclaje a la membrana interna del retículo y para la señal de retención de la proteína en este orgánulo.

Figura 1. Esquema de la localización de los polimorfismos detectados en el locus humano *UGT1A* en el cromosoma 2.



Las barras de colores muestran la localización de los exones 1 de cada uno de los polimorfismos que conforman el locus humano *UGT1A.* Las flechas superiores indican la dirección de transcripción y las flechas de colores describen la longitud de cada uno de los genes. Los datos fueron obtenidos de la base NCBI.

En la transcripción del locus *UGT1A*, se combinan los cuatros exones comunes, con uno de una serie numerada de forma consecutiva, del primer exón hacia el extremo 5´ del locus del gen, para formar individualmente productos génicos *UGT* (Tukey y cols., 2001). En 2009, se descubrió un segundo exón común 5 de *UGT1A*, denominado 5b, el cual es también usado alternativamente, produciendo 3 mRNA diferentes para un único miembro *UGT 1*(Ménard y cols., 2009; Guillemette y cols., 2010).

1.2.4. Polimorfismo metabólico de UGT1As

Las variaciones en los genes de la súper familia *UGT* han sido identificadas (Burchell, 2003). En la familia *UGT1*, han sido detectados los polimorfismos genéticos para *UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 y 1A10*. Se han descrito un gran número de variaciones genéticas, algunas de las cuales determinan el fenotipo metabólico de cada individuo, por lo que tendrían impacto farmacológico (Benoit-Biancamano y cols., 2009; Guillemette y cols., 2010). La variabilidad genética interindividual determina la diversidad enzimática, y por tanto, la eficiencia de la glucuronización, por lo que alteraciones genéticas del locus *UGT1,* tales como los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) o la variación en el número de copias (VNCs), pueden alterar la integridad estructural de la enzima o del nivel intrínseco de expresión, pudiendo afectar a la actividad de la enzima para la que codifica. En los últimos años, se ha reportado el impacto funcional que tiene esta variabilidad sobre la actividad de glucuronización, además del riesgo de enfermedades y toxicidad por fármacos (Guillemette, 2003; Nagar y Remmel, 2006; Maitland y cols., 2006; Ménard y cols., 2009; Lazarus y cols., 2009).

UGT1A4 es una de las enzimas UGT que presenta un mayor polimorfismo genético y, en consecuencia, con mayor potencial de relevancia clínica, siendo esta una de las razones por las que se ha planteado su estudio en la población española.

2. CITOCROMO P450 2C9 (CYP2C9)

En humanos, las enzimas CYP2Cs, componen una subfamilia de enzimas P450, que metabolizan aproximadamente un 20% de los fármacos usados en la práctica clínica. Está constituida principalmente por cuatro miembros, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19 (Goldstein, 2001). La identificación de cada uno de ellos ha sido bastante controvertida, pues presentan una homología de hasta un 96% entre cada una de las isoformas, tanto a nivel molecular como a nivel funcional, y todos los miembros de esta subfamilia exhiben polimorfismos genéticos (Goldstein y de Morais, 1994).

Históricamente, el primer polimorfismo de la subfamilia CYP2C fue descrito en los años '80, en un estudio del metabolismo del anticonvulsionante mefenitoína y la actividad enzimática de la mefenitoína hidroxilasa (CYP2C19), observándose la existencia de dos fenotipos metabólicos, EMs y PMs (Kupfer y Branch, 1985; Wilkinson y cols., 1989; Reviriego y cols., 1993; LLerena y cols., 1993).

Por su parte, la proteína CYP2C9, presenta 490 aminoácidos en su estructura primaria y un tamaño de aproximadamente 55 KDa (Goldstein y De Morais, 1994). Se expresa fundamentalmente en el hígado, en niveles que son los más altos entre las enzimas CYP2C y el segundo más alto entre las isoformas CYP (Miner y Birkett, 1998), representando alrededor del 20% del contenido CYP total hepático (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). En tejidos extrahepáticos la encontramos en el riñón, testículos, próstata, glándula adrenal, ovarios, corazón, aorta y otros vasos sanguíneos (Klose y cols., 1999; Delozier y cols., 2007). Es también detectable, a un nivel de expresión muy inferior, en intestino y páncreas (Wacke y cols., 1998). No está presente en esófago o estómago (De Waziers y cols., 1990). Miembros de la subfamilia CYP2C, como CYP2C8 y CYP2C18, han sido identificados en cerebro humano (McFayden y cols., 1998; Klose y cols., 1999). Esto sugiere que

otros miembros de esta misma subfamilia, como CYP2C9, podrían estar también presentes en tejido cerebral.

En humanos, la familia CYP2C metaboliza un amplio número de fármacos, principalmente mediante tres enzimas, CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 (Suarez-Kurtz y Sergio, 2007). CYP2C9 y CYP2C19 se diferencian en tan solo 43 de sus 490 aminoácidos (Goldstein y De Morais, 1994). Sin embargo, ambas enzimas tienen una especificidad de sustrato completamente diferente entre sí (Xie y cols., 2002).

La enzima CYP2C9 está involucrada en aproximadamente el 15-20 % de las reacciones de oxidación de fase I en el metabolismo de fármacos (>100 fármacos) (Shimada y cols., 1994; Rendicy Di Carlo, 1997; Lee y cols., 2002; Ali y cols., 2009). Proporciona la principal vía para metabolizar anticoagulantes, anticonvulsionantes y antidiabéticos orales. Algunos de estos fármacos con un margen terapéutico estrecho, como: S-warfarina, fenitoína y tolbutamida (Schwarz, 2003; Dorado y cols., 2007). También participa en el metabolismo de numerosos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el diclofenaco, piroxicam, tenoxicam, celecoxib e ibuprofeno (Leemann y cols., 1992; 1993; Pilotto y cols., 2007; Chan y cols., 2009), anticancerosos como el tamoxifeno (Zhou y cols., 2010), antihipertensivos como ibesartán y losartán (McCrea y cols., 1999; Chen y cols., 2006) y antidepresivos como amitriptilina. En algunos casos, el metabolismo de ciertos fármacos mencionados, genera metabolitos activos, como por ejemplo, metabolitos del tamoxifeno (N-Desmetil-tamoxifeno), losartán (E-3174) y amitriptilina (nortriptilina).

CYP2C9 también media la 3-hidroxilación de benzo[α]pirenos (B[a]P) y la activación metabólica de diversos PAH-dioles (hidrocarburos policíclicos aromáticos) a metabolitos activos en tasas menores que las enzimas CYP1 (Shimada, 2006), así como, participa en la generación de varios compuestos endógenos, relacionados con la inflamación y angiogénesis (9,10-epoxy-12-octadecanoate y 12,13-epoxy-9-octadecanoate) (Fortuny y cols., 2006), ácido araquidónico y

linoléico (Ingelman-Sundberg y cols., 2007), progesterona y testosterona (Yamazaki y Shimada, 1997) y 17α-etinilestradiol (Wang y cols., 2004).

Por otro lado, se ha identificado un sitio de unión de CAR (receptor nuclear NR1I3) y PXR (receptor nuclear NR1I2) en la zona promotora del gen *CYP2C9*, y parece que este sitio regula constitutivamente la transcripción a través de un mecanismo de CAR-dependiente (Gerbal-Chaloin y cols., 2002; Ferguson y cols., 2002).

2.1. Variabilidad del fenotipo metabólico CYP2C9

Los factores genéticos, no son los únicos determinantes de la variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos, otros factores influyentes, y en algún caso determinantes, son fisiológicos (edad, sexo, embarazo, edad, ejercicio, patologías, etc.) y/o ambientales (dieta, tabaco, ingesta de alcohol y otros xenobióticos). Por tanto, la genotipación presenta limitaciones para la interpretación de la capacidad metabólica de una determinada enzima. En consecuencia, se hacen necesarios los estudios de determinación del fenotipo metabólico, que describen la actividad enzimática en tiempo real, a través del uso de fármacos-tests específicos. La genotipación es clínicamente relevante cuando es el único determinante del fenotipo. Este caso se daría, casi exclusivamente en los PMs, ya que en el resto, el genotipo no está correlacionado con el fenotipo metabólico.

In vivo, el fenotipo metabólico CYP2C9, se ha estudiado con diferentes fármacos-test, tales como la tolbutamida, fenitoína, warfarina, losartán, diclofenaco y flurbiprofeno, ya sea individualmente o como parte de varios "cócteles" (Streetman y cols., 2000; Turpault y cols., 2009; De Andrés y cols., 2013). Para la evaluación de la capacidad de metabolización de fármacos de los miembros de la familia CYP, las condiciones a cumplir de un fármaco-tests son, como se expuso anteriormente, que sea altamente selectivo de la enzima CYP ha estudiar, seguro y bien tolerado por el individuo en estudios *in vivo*. Una de las limitaciones en el estudio de la actividad de la enzima CYP2C9 es la

falta de fármacos tests adecuados para estudios de determinación del fenotipo metabólico *in vivo* (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios de la actividad metabolizadora real de CYP2C9 en distintas poblaciones de voluntarios sanos realizados con diferentes fármacos test.

País	n	Fármaco- test	% PM	Referencia
Australia	63	Tolbutamida	1.6	Page y cols., 1991
Australia	106	Tolbutamida	0	Veronese y cols., 1993
Hungría	109	Tolbutamida	0.92	Kóbori y cols., 2008
España	206	Diclofenaco	0	Dorado y cols., 2003c
España	148	Diclofenaco	0	LLerena y cols., 2014
Cuba	160	Diclofenaco	0	LLerena y cols., 2014
Turquía	85	Losartán	0	Babaoglu y cols., 2004
Suecia	126	Losartán	0	Sandberg y cols., 2004
Ecuador	194	Losartán	0	Dorado y cols., 2012a
India	107	Losartán	14.3	Varshney y cols., 2013
Bélgica	122	Fenitoína	8	Horsmans y cols., 1997
Turquía	100	Fenitoína	1	Aynacioglu y cols., 1999
Estados Unidos	29	S-warfarina	0	Chainuvati y cols., 2003
Estados Unidos	17	Flurbiprofeno	0	Stewart y cols., 2011

n= número de individuos; **%PM**= "poor metabolizer", metabolizadores lentos

El problema de algunos de estos fármacos test, como fenitoína, tolbutamida o warfarina, es que presentan unos índices terapéuticos estrechos, con la potencial aparición de efectos adversos. Entre las alternativas con menor riesgo, el losartán y el diclofenaco, parecen ser los más seguros de usar

en los estudios con voluntarios sanos (Yasar y cols., 2002a; Dorado y cols., 2003a; 2003b; 2003c; LLerena y cols., 2014).

Las primeras observaciones de la variabilidad en la actividad del CYP2C9, en humanos, se observaron en un caso clínico, donde se reportó un cuadro de toxicidad por fenitoína (Kutt y cols., 1964). Posteriormente, en una población de 122 voluntarios sanos, se observó una distribución bimodal del índice de hidroxilación de fenitoína (Horsmans y cols., 1997). Aunque esta bimodalidad no pudo ser confirmada en un estudio posterior (Aynacioglu y cols., 1999), aunque se encontró una gran variabilidad en los ratios metabólicos de fenitoína y la influencia sobre esta, de los diferentes genotipos *CYP2C9*. En relación con el uso de tolbutamida, se reportó la existencia de una gran variabilidad interindividual en su metabolismo (Back y Orme, 1989), y se propuso un índice metabólico urinario (IM) para tolbutamida, igual a la excreción de la combinación entre los metabolitos resultantes de la hidroxilación de tolbutamida (hidroxitolbutamida y carboxitolbutamida) dividido por la cantidad de tolbutamida sin metabolizar, como una medida de la actividad de CYP2C9 *in vivo* (Veronese y cols., 1990; 1993).

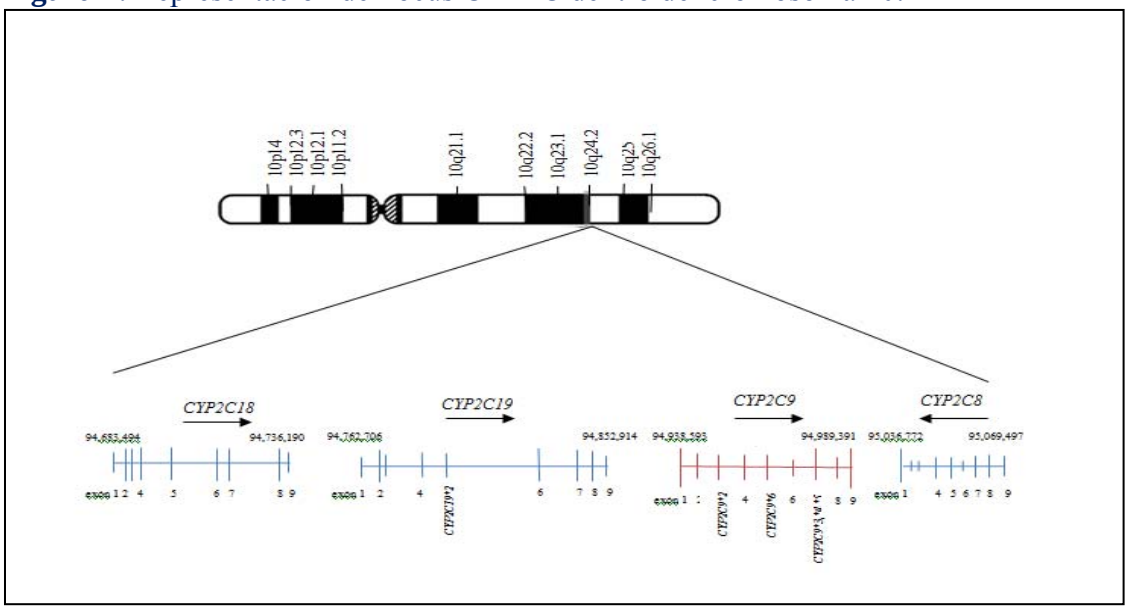
Como hemos comentado anteriormente, el uso de fenitoína y tolbutamina, en los estudios en voluntarios sanos para la determinación del fenotipo metabólico CYP2C9, presenta un problema, y es que con ambos sustratos, existe el riesgo de desencadenar potenciales efectos adversos, tales como hipoglucemia, en el caso de tolbutamida, o toxicidad y/o colapsos cardiovasculares con fenitoína.

Por tanto, se han utilizado otros fármacos test más seguros y eficientes para estudios en humanos, como el diclofenaco (Tang y cols., 1999; Dorado y cols., 2003c, LLerena y cols., 2014) o losartán (Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004; Dorado y cols., 2012a).

2.2. Polimorfismo genético del *CYP2C9*

El gen *CYP2C9,* que codifica para la proteína del mismo nombre, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 10 humano, concretamente en la región 10q24.2, con una longitud de aproximadamente de 51 kb (Gray y cols., 1995; Xie y cols., 2002) (Fig. 2).

Figura 2. Representación del locus CYP2C dentro del cromosoma 10.



Esta figura describe el tamaño proporcional y localización de los principales polimorfismos del locus humano *CYP2C,* con sus respectivos exones. Las flechas indican la dirección de transcripción. Los datos fueron obtenidos de la base NCBI.

Está próximo a la región en tándem que contiene los genes *CYP2C8, CYP2C18 y CYP2C19* (de Morais y cols., 1993), formando parte del cluster *CYP2C* (Gray y cols., 1995). Estructuralmente, su ADNc posee 9 exones y 6 sitios de reconocimiento de sustratos (SRSs) (Gotoh, 1992).

La regulación de *CYP2C9* ocurre, principalmente, a nivel de transcripción. La región promotora contiene una secuencia de 15 pb que presenta una alta homología con una secuencia consenso de inducción por barbitúricos, descrita en los genes *CYP2B1 y CYP2B2* (Dorado, 2003). Se ha

sugerido la posible implicación de los receptores PXR y/o CAR en la regulación de la expresión del *CYP2C9* (Gerbal-Chaloin y cols., 2002, Ferguson y cols., 2002).

Este gen, al igual que la mayoría de genes *CYPs,* es altamente polimórfico y hasta el momento, se han descrito 65 variantes o alelos *(*1A-*58*) junto con sus respectivas subvariantes, donde la variante *CYP2C9*1A* corresponde al "wild-type" (wt). La mayoría de mutaciones que presenta el gen *CYP2C9* son SNPs, describiéndose alrededor de 43 SNPs entre las regiones regulatorias y codificantes del gen *CYP2C9* (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Estas mutaciones se encuentran principalmente localizadas en el exón 7 y en menor medida en los exones 3 y 5 (Tabla 2).

Tabla 2. Variantes alélicas más frecuentes del gen *CYP2C9*.

Variante alélica	Proteína	Cambio en nucleótido	Exón	Actividad enzimática *in vivo*	Actividad enzimática *in vitro*	Referencia
**1*	CYP2C9.1	No	-	Normal	Normal	Romkes y cols., 1991
**2*	CYP2C9.2	430C>T	3		Disminuida	Crespi y Millers, 1997
**3*	CYP2C9.3	1075A>C	7	Disminuida	Disminuida	Sullivan-Klose y cols., 1996
**4*	CYP2C9.4	1076T>C	7			Imai y cols., 2000
**5*	CYP2C9.5	1080C>G	7		Disminuida	Dickmann y cols., 2001
**6*	CYP2C9.6	818delA	5	Ninguna		Kidd y cols., 2001

Adaptado de http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm.

No todas las variantes alélicas del *CYP2C9* tienen la misma repercusión funcional. Siete variantes de *CYP2C9* codifican proteínas con una actividad disminuida (*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *11, *13 y *14*), *CYP2C9*8* se ha visto estar involucrada en una actividad enzimática incrementada *in vitro* y disminuida *in vivo* y *CYP2C9*6* da lugar a una enzima CYP2C9 con actividad nula (Kiddy cols., 2001).

Las variantes más frecuentes en caucásicos, que modifican el funcionamiento de CYP2C9, son las variantes *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3,* por lo que estas son las más estudiadas. La variante *CYP2C9*2* se caracteriza por la sustitución de una citosina (C) por timina (T) en el exón 3, posición 430 del

gen, dando lugar a una sustitución de los aminoácidos arginina (Arg) por cisteina (Cys) en la posición 144 de la proteína (Arg144Cys), desencadenando un cambio en la lectura de CGT>TGT (*430C>T; R144C*). La sustitución no sinónima R144C sugirió afectar la interacción entre la enzima CYP2C9 oxidasa y la CYP450 reductasa (Crespi y cols., 1997), lo que explicaría el metabolismo lento de algunos sustratos por el CYP2C9. Se ha publicado un efecto significativo de este alelo en el aclaramiento de S-warfarina, acenocoumarol, tolbutamida y celecoxib, pero no de otros fármacos como diclofenaco (Ingelman-Sundberg y cols., 2007).

*CYP2C9*3* es un cambio de nucleótido de adenina (A) por citosina (C), en la posición 1075 del exón 7 en el gen que da lugar a un cambio de lectura ATT>CTT, lo que conlleva a la sustitución del aminoácido interleucina en la posición 359 por leucina en la proteína. El residuo 359 está localizado en el sitio activo de la enzima, donde participa en el reconocimiento de sustratos (Gotoh y cols., 1992). En diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, la presencia de esta variante da como resultado un enzima, con una significativa disminución en la actividad catalítica hacia varios sustratos, en comparación al tipo silvestre (Takanashi y cols., 2000; Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Se ha observado como individuos heterocigotos y homocigotos, para la variante *CYP2C9*3,* tienen aproximadamente el 50% del aclaramiento total de fármacos sustratos de esta enzima, en comparación con individuos "wild type", lo que supone una reducción de 5 a 10 veces en su capacidad metabólica (Ingelman-Sundberg y cols., 2007).

El alelo *CYP2C9*4* es un polimorfismo "sin sentido" que desencadena un cambio del aminoácido interleucina por tirosina en la posición 359 de la proteína, generado por la sustitución de T por C en la secuencia de nucleótidos en el exón 7 (*1076T>C; Ile359Thr*). Este alelo fue identificado originalmente en un paciente japonés epiléptico con una reacción adversa a fenitoína (Imai y cols., 2000).

Por otro lado, el alelo *CYP2C9*5* contiene la transversión de C por guanina (G), en la posición 1080 en el exón 7 (*1080C>G*), produciendo una sustitución del aminoácido asparragina por

glutamina (Asn360Glu) en la proteína. Esta mutación ha sido encontrada, por el momento, exclusivamente en poblaciones con ancestría africana (Dickmann y cols., 2001; Allabi y cols., 2004:2005; Suarez-Kurtz y cols., 2012; Hirota y cols., 2013). Al igual que ocurre con los alelos *CYP2C9*3*, *CYP2C9*4* y *CYP2C9*5*, afectan a dos aminoácidos muy cercanos al sitio de interacción de la enzima con el sustrato (Ile359 y Asp360), dando lugar a enzimas con una afinidad alterada (Sullivan-Klose y cols., 1996; Imai y cols., 2000; Dickmann y cols., 2001).

También ha sido identificada una variante denominada *CYP2C9*6*. Este alelo se caracteriza por una delección cerca del extremo 3´del exón 5, concretamente en la adenina de la posición 818 (*818delA*), produciendo un codón de parada prematura que originaría una proteína totalmente inactiva (Kidd y cols., 2001; Van Schaik, 2005; Dorado y cols., 2007). Esta mutación fue originalmente identificada en un paciente afro-americano altamente sensible a fenitoína (Kidd y cols., 2001).

Todas las mutaciones descritas se encuentran en exones del gen *CYP2C9*, pero existen mutaciones en intrones que podrían estar relacionadas con alteraciones en la actividad metabólica de la enzima. El ADNc del gen *CYP2C9* posee 9 exones y 6 sitios de reconocimiento del sustrato (SRSS). Tal es el caso del SNP intrónico *IVS8-109 A>T* (rs1934969), situado en el intrón 8, entre los exones 8 y 9 del gen *CYP2C9*. Este SNP se localiza hacia la izquierda de la secuencia AG, implicada en el sitio de reconocimiento y corte ("*splicing*"), entre el exón y el intrón 8 correspondiente. Esta variante viene dada por un cambio en la posición 109, en la secuencia de ADNc, de la base adenina original (A) por una timina (T).

Este SNP (*IVS8-109 A>T*) fue secuenciado por primera vez en una población de sujetos japoneses (*n*=263) (Maekawa y cols., 2006). El objetivo del estudio fue buscar SNPs en la región promotora del gen *CYP2C9*, que fueran responsable de la alteración en la actividad metabólica. La población referida presentó una frecuencia alélica de 0.456, mayoritariamente en heterocigosis, mostrando una fuerte relación con otros SNPs del gen *CYP2C9* en las regiones 5´-UTR, entre el exón 1 y el intrón1

(Maekawa y cols., 2006). Este SNP está formando parte de diferentes haplotipos de *CYP2C9,* presentes en una población japonesa y coreana estudiada (Maekawa y cols., 2006; Lee y cols., 2010). Por otro lado, la asociación entre este SNP y un alto IM de losartán ha sido descrita en un grupo de voluntarios sanos suecos (Hatta y cols., 2012), donde los individuos portadores del alelo *T*, aparecían en mayor porcentaje entre aquellos que presentaban los IM de losartán más altos, en comparación con aquellos que presentaban valores de IM más bajos. Sin embargo, en ese mismo estudio, la asociación entre una alta frecuencia del alelo *T* con un alto IM, fue únicamente observada en el grupo de voluntarios suecos, pero no en otra población coreana también evaluada en el mismo trabajo (Hatta y cols., 2012). Por tanto, sería necesario realizar estudios confirmatorios en otras poblaciones, con el fin de determinar, la potencial influencia de esta mutación intrónica sobre la actividad metabólica del CYP2C9.

2.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético del *CYP2C9*

Existen diferencias en las frecuencias que presentan los alelos del gen *CYP2C9* en poblaciones de distinto origen étnico. Las variantes alélicas más frecuentes son *CYP2C9*1* ("wildtype" o silvestre), *CYP2C9*2* y **3*. En la frecuencia de distribución de los alelos *CYP2C9*2* y **3* se observa variación entre poblaciones, estando ambos alelos presentes principalmente en caucásicos y siendo menos frecuentes en africanos y asiáticos.

El *CYP2C9*2* muestra una heterogeneidad en la población caucásica que oscila entre 8.8% y un 16.5% (Stubbins y cols., 1996; Aithal y cols., 1999; Yasar y cols., 1999; Scordo y cols., 2001;2004; García-Martín y cols., 2001; Burian y cols., 2002; Xie y cols., 2002; Bozina y cols., 2003; Dorado y cols., 2003c; Gaikovitch y cols., 2003; Allabi y cols., 2003; Sandber y cols., 2004; Bodin y cols., 2005; Halling y cols., 2005; Pedersen y cols., 2004). En la población turca aparece en un 10% (Aynacioglu y cols., 1999; Yilmaz y cols., 2001; Babaoglu y cols., 2004). En poblaciones negras

africanas, la frecuencia del alelo *CYP2C9*2* es del 3% (Van Schaik, 2005), en poblaciones etíopes del 4.3% (Scordo y cols., 2001) y en poblaciones afro-americanas del 2.5% (Sullivan-Klose y cols., 1996; Dickmann y cols., 2001). Sin embargo, en poblaciones de indígenas africanas de Benin, esta variante no ha sido encontrada. Por otro lado, en poblaciones asiáticas (chinas, coreanas y japoneses), el alelo *CYP2C9*2* tampoco ha sido detectado (Wang y cols., 1995; Nasu y cols., 1997; Kimura y cols., 1998; Yoon y cols., 2001; Gaedigk y cols., 2001; Yu y cols., 2004; Kirchheiner y Brockmoller, 2005), excepto en un estudio en una población china dónde se encontró en un único individuo (Yang y cols., 2004).

En poblaciones hispanas no hay muchos estudios hasta la fecha. La variante *CYP2C9*2* ha sido reportada en una población de origen hispano (Xie y cols., 2002), que presentó una frecuencia para este alelo del 12%. En poblaciones mexicanas se han encontrado con frecuencias del 6% y 10% (Machorro-Lazo y cols., 2003; Aguilar y cols., 2008), y en población méxico-americana una frecuencia del 8% (LLerena y cols., 2004), comparable a poblaciones caucásicas, aunque más alta que las encontradas en poblaciones afro-americanas y africanas negras. En una población boliviana (Bravo-Villalta y cols., 2005) y brasileña se han observado unas frecuencias del alelo *CYP2C9*2* del 4.8% y 9%, respectivamente. Sin embargo, al estratificar la población brasileña por grupos, negros, mestizos y blancos, las frecuencias que se encontraron fueron del 4%, 7% y 12%, respectivamente (Vianna-Jorge y cols., 2004). En una población ecuatoriana, la frecuencia del alelo *CYP2C9*2* (5.4%) fue similar a la encontrada en poblaciones mexicanas-mestizas y mexicanas americanas (Dorado y cols., 2012a), así como con una población cubana-mestiza (6%; LLerena y cols., 2014)

Por otro lado, en un estudio de 6 grupos de origen étnico méxico-amerindio (tepehuanos, mexicaneros, huicholes, seris, guarijíos, mayos, coras, tarahumaras) la frecuencia de este alelo apareció en 0 %, 0 %, 0 %, 2.6 %, 0%, 5.7%, 0% y 0% respectivamente (Sosa-Macías ycols., 2013).

Este resultado está en concordancia con la baja frecuencia de poblaciones orientales y por tanto, con la hipótesis de la ancestría oriental de estas poblaciones.

Las frecuencia más alta de este alelo en poblaciones hispanas las encontramos en la población española y en una cubana de ancestría europea, presentando unas frecuencias del 16 y 17%, respectivamente (Dorado y cols., 2003c; 2011; LLerena y col., 2014).

La variante *CYP2C9*3* aparece con su frecuencia más alta en las poblaciones caucásicas, con valores de entre 5-17% (Stubbins y cols., 1996; Aithal y cols., 1999; Yasar y cols., 1999; Scordo y cols., 2001;2004; García-Martín y cols., 2001; Burian y cols., 2002; Xie y cols., 2002; Dorado y cols., 2003c; Gaikovitch y cols., 2003; Allabi y cols., 2003; Bozina y cols., 2003; Pedersen y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004; Bodin y cols., 2005; Halling y cols., 2005). En poblaciones asiáticas las frecuencias alélicas más altas encontradas han sido del 4.9% en una población china (Gaedigk y cols., 2001), 2.1% en japoneses (Nasu y cols., 1997) y del 1.1% coreanos (Yoon y cols., 2001). La población etíope presenta una frecuencia del 2.3% (Scordo y cols., 2001) y en población negra se ha encontrado en una frecuencia del 1.3% (Van Schaik, 2005). Al contrario, en indígenas africanos benineses está ausente (Allabi y cols., 2003).

Por otro lado, la variante *CYP2C9*3* se ha reportado en una población hispana con una frecuencia del 3.4% (Xie y cols., 2002), valores más bajos que los observados en poblaciones caucásicas. En poblaciones mexicanas del oeste, mexicanas mestizas, tepehuanas así como ecuatorianos y bolivianos mestizos, estas frecuencias oscilan entre el 1.5 y 6% (Llerena y cols., 2004; Aguilar y cols., 2008; Dorado y cols., 2011; Dorado y cols., 2012a; Bravo-Villalta y cols., 2005), valores menores que los encontrados en la población española (8-10%) (Dorado ycols., 2003c; 2011) o en la población cubana (9-11%; LLerena y cols., 2014). En un estudio realizado en una población de brasileños, donde se distinguieron según su raza, en negros, mestizos y blancos, la frecuencia encontrada para el grupo en general era de 6.5%, siendo para los respectivos subgrupos de negros, mestizos y blancos de 3%, 7% y 8% (Vianna-Jorge y cols., 2004).

El alelo *CYP2C9*4* se ha identificado únicamente en un individuo japonés (VanSchaik, 2005) y no se ha identificado esta variante en otras poblaciones estudiadas como la caucásica (Dickmann y cols., 2001; Allabi y cols., 2003; LLerena y cols., 2004), blanca-americana (Gaedigk y cols., 2001), china (Gaedigk y cols., 2001; Xie y cols., 2002; Van Schaik, 2005), afro-americana (Dickmann y cols., 2001), indígenas africanos benineses (Allabi y cols., 2003), población inuit e indios nativos canadienses (Gaedigk y cols., 2001).

En poblaciones hispanas como la mexicana (Dorado y cols., 2011) o la ecuatoriana (Dorado y cols., 2012a) no ha sido detectada.

La variante alélica *CYP2C9*5* se describió por primera vez en una población afro-americana con una frecuencia de 1.7% (Dickmann y cols., 2001). También se ha visto la presencia de este alelo en la población negra africana, con una frecuencia de 0.8% (Yasar y cols., 2002b) y del 1.8% en indígenas africanos beninenses (Allabi y cols., 2003). En la población caucásica solo se ha encontrado en un estudio (Van Schaik, 2005), mientras que en otros estudios no ha sido reportada (Dickmann y cols., 2001; Allabi y cols., 2003; LLerena y cols., 2004). Tampoco ha sido posible identificarla en las poblaciones orientales de Corea y en etíopes (Yasar y cols., 2002b). En las poblaciones iberoamericanas estudiadas hasta la fecha como la mexicana-mestiza y tepehuana, mexicana-mestiza americana y ecuatoriana está ausente (Dorado y cols., 2011; 2012a).

El alelo *CYP2C9*6* se ha descrito en afro-americanos con una frecuencia de 0.6% (Kidd y cols., 2001) y en un individuo mexicano-mestizo (Dorado y cols., 2011). Sin embargo, no se ha encontrado en poblaciones caucásicas (Van Schaik, 2005) ni en chinos (Yu y cols., 2004). Esta variante no ha sido tampoco encontrada en diferentes poblaciones iberoamericanas estudiadas como cubana, ecuatoriana o española, (Dorado y cols., 2012a; LLerena y cols., 2004; 2014).

En relación al SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*, se han realizado pocos estudios sobre la frecuencia de esta mutación en poblaciones con diferentes orígenes étnicos. Las frecuencias alélicas que se conocen hasta ahora son las de las poblaciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencias del alelo *IVS8-109T* en diferentes poblaciones.

Población de estudio	n	Frecuencia *IVS8-109T*	Referencias
Japonesa	263	0.456	Maekawa y cols., 2006
Coreana	128	0.371	Hatta y cols., 2012
Coreana	50	0.420	Lee y cols., 2010
Sueca	85	0.318	Hatta y cols., 2012

n= número de sujetos.

Actualmente se desconocen las frecuencias del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* en la población española así como en poblaciones iberoamericanas.

2.4. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9 con losartán

Losartán es el primer antagonista selectivo del receptor de la angiotensina II usado como fármaco antihipertensivo. A partir de su metabolismo se han identificado seis metabolitos (Lo y cols., 1995). Este fármaco se metaboliza principalmente por CYP2C9 a un metabolito intermedio (E-3179) y por último, al ácido carboxílico de losartán (E-3174), participando también la enzima CYP3A4 (Stearns y cols., 1995; Yun y cols., 1995; Yasar y cols., 2001). Estas dos enzimas, CYP2C9 y CYP3A4, son capaces de oxidar a ambos sustratos, losartán y el aldehído E-3179 (metabolito inactivo), a ácido carboxílico E-3174 (metabolito predominantemente activo). Aunque solamente el 14% de losartán es metabolizado a E-3174, el área bajo la curva (AUC) de este último, es entre 4 y 8 veces más alta que la de losartán y por tanto se le considera el principal responsable de la actividad farmacológica (Lo y cols., 1995). La excreción urinaria y fecal de losartán es de un 35% y 65% de la dosis, respectivamente (Nakashima y Umemura, 1996). Estudios en voluntarios sanos han descartado la

participación de las enzimas CYP2D6 y CYP2C19 en la biotransformación de losartán (Sanwall y cols., 1999).

Se ha comprobado que fluconazol, un inhibidor de CYP3A4 y CYP2C9, disminuye el metabolismo de losartán a E-3174 (Kazierad y cols., 1997; Kaukonen y cols., 1998) al disminuir el AUC y la concentración máxima (C_{max}) de E-3174 en un 43% y 56% respectivamente, e incrementar el AUC y la C_{max} de losartán en un 60% y 30%, respectivamente (Kazierad y cols., 1997). Sin embargo, itraconazol y oketoconazol, inhibidores selectivos de CYP3A4, no parecen tener un efecto significativo en el metabolismo de losartán *in vivo* (Kaizerad y cols., 1997; Kaukonen y cols., 1998). Además, la administración conjunta de losartán y eritromicina, un inhibidor de CYP3A4, no tiene tampoco un efecto clínicamente significativo sobre el metabolismo de losartán (Willianson y cols., 1998). Estos resultados sugieren la mayor relevancia de la enzima CYP2C9 en la biotransformación de losartán a su metabolito E-3174.

El efecto del genotipo *CYP2C9* sobre el metabolismo de losartán ha sido puesto de manifiesto en un caso clínico. Un individuo con el genotipo *CYP2C9*3/*3* convirtió menos del 1% de la dosis administrada de losartán a E-3174 (McCrea y cols., 1999). Posteriormente, el efecto del genotipo *CYP2C9* en la farmacocinética de losartán *in vivo*, ha sido descrito en una población sueca, española y una ecuatoriana (Yasar y cols., 2002a; Dorado, 2003; 2012a), donde se pudo demostrar que el alelo *CYP2C9*3* está asociado con una disminución en la formación de E-3174 a partir de losartán.

Se necesitan más estudios del fenotipo metabólico CYP2C9 para conocer la actividad metabólica de esta enzima, así como la relación que guarda esta actividad con el polimorfismo genético y la variabilidad interétnica que muestra en las distintas poblaciones.

2.5. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *CYP2C9*

Como se ha expuesto previamente, el polimorfismo genético y la presencia de las diferentes variantes alélicas del *CYP2C9*, pueden influir en la actividad metabólica de esta enzima, desencadenando un descenso de esta. Las dos variantes alélicas más comunes implicadas en una reducción de la actividad enzimática son *CYP2C9*2* (Rettie y cols., 1994) y *CYP2C9*3* (Sullivan-Klose y cols., 1996). Ambas están en un porcentaje aproximado de 35% en caucásicos (Lee y cols., 2002; Kirchheiner y Brockmoller, 2005), pero son relativamente raros en las poblaciones asiáticas y africanas (Xie y cols., 2002).

La enzima CYP2C9 tiene un papel principal en el metabolismo de antagonistas de la vitamina K, fármacos antiinflamatorio no esteroideos (AINES), sulfonilureas, antagonistas del receptor de angiotensina II y fenitoína. En un estudio con pacientes en tratamiento con tolbutamida, aquellos que presentaban los genotipos *CYP2C9*3/*3* y *CYP2C9*2/*3*, mostraron un incremento en la vida media y una reducción en el aclaramiento del fármaco, en comparación con un grupo de pacientes control (Sullivan-Klose y cols., 1996; Kirchheiner y cols., 2002).

En estudios con pacientes epilépticos en tratamiento con fenitoina (van der Weide y cols., 2001; Caraco y cols., 2001) se observó que los portadores de al menos una variante alélica del *CYP2C9* (*CYP2C9*2* o *CYP2C9*3*), requerían una dosis de fenitoína significativamente más baja que la de los individuos *CYP2C9*1/*1* (Dorado y cols., 2013). Resultados similares se encontraron en poblaciones de estudio turca (Aynacioglu y cols., 1999), japonesa (Mamiya y cols., 1998) y taiwainesa (Hung y cols., 2004).

También se ha podido observar algunos casos donde se relacionó el genotipo CYP2C9 con intoxicación por fenitoína, como el de un paciente con genotipo *CYP2C9*1/*3* (Ninomiya y cols., 2000) y otro con el genotipo *CYP2C9*1/*4* (Ieiri y cols., 2000), que mostraron alteraciones significativas en la farmacocinética del fármaco, así como en sus efectos adversos. Y una sobredosis por fenitoína en un paciente que expresaba el genotipo *CYP2C9*3/*3* (Brandolese y cols., 2001).

Otro caso clínico fue el de un paciente afro-americano, altamente sensible a fenitoína, por presentar un genotipo homocigoto para el alelo "nulo" *CYP2C9*6* (Kidd y col., 2001). Además, otro estudio ha mostrado un incremento en el riesgo de reacciones neurológicas adversas en una población del sur de India, cuando estos individuos eran portadores del alelo *CYP2C9*3* (Kesavan y cols., 2010). Recientemente, se ha descrito un caso pediátrico, en el que una paciente de dos años de edad, experimentó una intoxicación severa por fenitoína, presentando un genotipo homocigoto para *CYP2C9*2* (Dorado y cols., 2013).

En estudios en pacientes en tratamiento con warfarina, se ha descrito que individuos portadores de los alelos *CYP2C9*2* y/o *CYP2C9*3* tuvieron una reducción en el aclaramiento de warfarina (Furuya y cols., 1995; Takahashi y cols., 1998; Aithal y cols., 1999; Margaglione y cols., 2000, Sanderson y cols., 2005) lo que condujo a un aumento de las hemorragias junto con hospitalizaciones más prolongadas que los que presentaban el genotipo *CYP2C9*1/*1* (Aithal y cols., 1999; Margaglione y cols., 2000; Taube y cols., 2000). También se ha descrito el caso de una paciente con genotipo *CYP2C9*2/*3,* que en tratamiento con warfarina, presentó una hemorragia gastrointestinal (Bloch y cols., 2002). Así, se han publicado numerosas guías acerca del uso de las pruebas farmacogenéticas para la dosificación de este fármaco (Johnson, y cols. 2011).

Se ha mostrado el caso de una potenciación de la anticoagulación por **acenocumarol** en dos pacientes homocigotos para el alelo *CYP2C9*3*, los cuales se encontraban en tratamiento con la dosis diaria recomendada de este fármaco (Verstuyft y cols., 2001). Algunos estudios muestran una necesidad de disminuir la dosis de acenocumarol en individuos portadores de la variante *CYP2C9*2* (Visser y cols., 2004; Spreafico y cols., 2008).

Otro de los factores que puede influir en la aparición de efectos adversos es la toma concomitante de fármacos metabolizados por el CYP2C9, es decir, a partir de una potencial interacción metabólica. Una paciente en tratamiento con clopidogrel y celecoxib, presentó una hemorragia intracraneal, posteriormente a la administración de estos fármacos (Fisher y Le Couteur, 2001). Los

autores de este estudio clínico han sugerido que la hemorragia pudo ser debida a una interacción farmacocinética mediada por el citocromo CYP2C9 (Fisher y Le Couteur, 2001).

Se ha descrito el caso de un paciente en tratamiento con fluorouracilo y fenitoína que padeció efectos adversos los cuales desaparecieron al reducir la dosis de fenitoína. La causa más probable de lo sucedido pudo ser la inhibición de CYP2C9 (Gilbar y Brodribb, 2001). Otros casos de intoxicación reportados debidos a la interacción de fármacos metabolizados por el CYP2C9, son aquellos desencadenados por la administración conjunta de fenitoína y tolbutamida (Wesseling y Mols-Thurkow, 1975; Beech y cols., 1988). En un estudio en el que se evaluó la posible interacción entre losartán y fenitoína en 16 voluntarios sanos (Fischer y cols., 2002), se concluyó que losartán no tenía efecto sobre la farmacocinética de fenitoína, pero que fenitoína sí inhibía la conversión de losartán a E-3174 mediada por el CYP2C9.

También se ha descrito la situación de un paciente que sufría una intoxicación severa por fenitoína cuando este anticonvulsionante se le coadministró con fluconazol, un inhibidor de CYP2C9 (Helldén y cols., 2010). El paciente estaba en tratamiento con altas dosis de fenitoína debido a un metabolismo incrementado para este fármaco. Un estudio con el fármaco-test losartán (Christensen y cols. 2003) mostraba un IM<0.13, el cual supone una tasa metabólica más rápida que la encontrada en una población de 190 voluntarios sanos suecos usados como control (Helldén y cols., 2010) y al ser tratado con un inhibidor de la enzima CYP2C9 entró en situación crítica.

En conclusión, aquellos individuos con el alelo *CYP2C9*2* o *CYP2C9*3* y que se encuentren en tratamiento concomitante con fármacos sustratos o inhibidores del CYP2C9, potencialmente estarán en mayor riesgo de experimentar la aparición de efectos adversos peligrosos que el resto de la población.

3. UDP-GLUCURONOSILTRANSFERASA 1A4 (UGT1A4)

La proteína UGT1A4 se expresa principalmente en el hígado, conductos biliares, colon, intestino delgado y en placenta humana (Strassburg y cols., 1997; 1998; Reimers y cols., 2011). Esta enzima muestra actividad catalítica en compuestos químicos, entre los que se incluyen hormonas, bilirrubina, esteroides y ácidos biliares, así como hidrocarburos aromáticos policíclicos, heterocíclicos, aminas primarias, secundarias y terciarias (Miners y cols., 2004; Sun y cols., 2007). Está involucrada en el metabolismo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), opioides como la morfina y otra serie de fármacos de uso terapéutico incluyendo la nicotina, además de una serie de medicamentos psiquiátricos como los antidepresivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina y trifluoperazina), antipsicóticos y anticonvulsionantes como lamotrigina (LTG) y fenitoína (Yamanaka y cols., 2005; Rowland y cols., 2006), aunque se ha visto que otras enzimas UGTs como UGT1A1 y UGT2B7 contribuyen también a la glucuronización de LTG (Rowland y cols., 2006; Argikar y cols., 2009; Sánchez y cols., 2010). También participa en el metabolismo de fármacos anticancerígenos como tamoxifeno (Ehmer y cols., 2004; Saeki y cols., 2005; Benoit-Biankamano y cols., 2009; Argikar y cols., 2009), que es convertido en diferentes compuestos incluyendo el metabolito activo 4-OH tamoxifeno (Sun y cols., 2007; Benoit-Biankamano y cols., 2009).

3.1. Variabilidad del fenotipo metabólico UGT1A4

La enzima UGT1A4 es la principal responsable, junto con UGT1A3, de la adicción del ácido glucurónico a grupos amino para formar un producto N-glucuronido, proceso que se conoce con el nombre de N-glucuronización de estos fármacos (Green y cols., 1996; Green y cols., 1998). Por otra parte, diferentes estrógenos y andrógenos también son sustratos de UGT1A4 (Saeki y cols., 2005).

Esta enzima tiene la capacidad de generar uno de los glucurónidos carcinógenos de la dieta, el 2-hidroxiamino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina (N-OH-PhlP), encontrado en la carne cocinada (Benoit-Biankamano y cols., 2009).

UGT1A4 también muestra actividad O-glucuronidación de compuestos esteroideos y fotoquímicos como quercetina, kaempferol y galato de epigalocatequina (Mohamed y Frie, 2011). En el proceso de oxidación de la fenitoína a 5-(4´-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína (4´-HFFH), este es, a su vez, convertido a 4´-HFFH-O-glucorónido por UGT1A1 y UGT1A4 en microsomas hepáticos humanos (Nakajima y cols., 2002). Se ha sugerido que el polimorfismo genético en esta isoformas UGT pueden ser la causa de las diferencias interindividuales en la O-glucuronizaciónde 4´-HFFH en humanos (Nakajima y cols., 2002).

Actualmente no se conocen estudios de fenotipación *in vivo* de la enzima UGT1A4.

3.2. Polimorfismo genético de *UGT1A4*

El gen *UGT1A4* está situado en la región 2q37.1 y presenta la misma estructura que los genes que constituyen el locus *UGT1A* (Chatzistefanidis y cols., 2012). Codifica para la isoenzima UGT1A4 y es altamente polimórfico. Hasta la fecha se han descrito 16 variantes genéticas con 109 polimorfismos (SNPs) reportados en la base de datos publicada para este gen (http:www.ugtalleles.ulaval.ca).

Se han encontrado SNPs en la región promotora, en el exón 1 y el intrón 1. Entre las variantes polimórficas se encuentran SNPs cuyo cambio de nucleótido resulta en un cambio de aminoácido. Algunas de estas mutaciones son sinónimas, otras no sinónimas, otras delecciones y otras introducen un codón de parada en la traducción. Existen también variantes que afectan a la región promotora, modificando la expresión del gen y otras resultan en splicing aberrante (Ehmer y cols., 2004; Saeki y cols., 2005; Benoit-Biankamano y cols., 2009; Chatzistefanidis y cols., 2012).

Entre los polimorfismos más frecuentes reportados para *UGT1A4* se encuentran *UGT1A4*2* (*70 C>A; P24T*) y *UGT1A4*3* (*142T>C; L48V*), consideradas variaciones naturales de este gen (Ehmer y cols., 2004; Wiener y cols., 2004). Las frecuencias de estas variantes genéticas se han descrito para las poblaciones caucásicas y japonesas. En un estudio en una población de voluntarios sanos se pudo observar una disminución de la glucuronidación en la biotransformación de β-naftilamina y bencilamina en un 30% y 50%, respectivamente y de hasta un 50% para dihidrotestosterona (Ehmer y cols., 2004) en portadores de estas variantes.

Estos polimorfismos fueron detectados en dos codones dentro del primer exón; en el codón 24 se da un cambio transversional en la posición 1 de una citosina (C) por una adenina (A), resultando en un cambio de aminoácido de prolina (P) a treonina (Thr). Este SNP se encuentra ubicado en la posición 70 del gen, identificado como *UGT1A4*2* (acn.AF465196) (Ehmer ycols., 2004; Benoit-Biankamano y cols., 2009; Ménard y cols., 2009; Guillemette y cols., 2010). En el codón 48 el cambio transversional en la posición 1 es de timina (T) por guanina (G), resultando en un cambio de aminoácido de leucina (Leu) por valina (Val) (Ehmer y cols., 2004). Este SNP Leu48Val se encuentra ubicado en la posición 142 del gen y está identificado como *UGT1A4*3* (acn. AF465197) (Ehmer y cols., 2004; Benoit-Biankamano y cols., 2009; Ménard y cols., 2009; Guillemette y cols., 2010).

Diferentes estudios muestran que ambos polimorfismos presentes en un mismo individuo se encuentran en desequilibrio de ligamiento para la población caucásica (Ehmer y cols., 2004), pero no para la población caucásica franco-canadiense (Ménard y cols., 2009). Otra variante, que ha sido reportada y cuya prevalencia se da con alta frecuencia en caucásicos, entre 17-21%, es el polimorfismo sinónimo *UGT1A4*1b*, correspondiente a un cambio de C por T en la secuencia de ADNc, que conlleva a un cambio de aminoácido Cys por otra Cys en la posición 157 (*c.471C>T*; C157C) (Ehmer y cols., 2004; Ménard y cols., 2009).

3.3. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4*

La frecuencia de los dos polimorfismos más comunes de *UGT1A4* ha sido estudiada en diferentes poblaciones (Tabla 4), tales como japoneses (Saeki y cols., 2005; Mori y cols., 2005; Saeki y cols., 2006), coreanos (Yea y cols., 2008), jordanos (Hakooz y cols., 2012), alemanes (Ehmer y cols., 2004), asiáticos (Thomas y cols., 2006), franco-canadienses (Ménard y cols., 2009) y africanos (Proyecto Genoma. http://www.1000genomes.org/).

La variante *UGT1A4*1b* (C157C; c. 471C>T) se ha reportado con una alta frecuencia en caucásicos (20.9% en franceses-canadienses y 17.6% en otra población caucásica de estudio) (Ehmer y cols., 2004; Ménard y cols., 2009). Por otro lado, las variantes *UGT1A4*2* (P24T) y *UGT1A4*3* (L48V) están presentes en un 5-9% y 8-11% en caucásicos y 0% y 20% en asiáticos, respectivamente (Tabla 4).

La frecuencia de los polimorfismos genéticos del gen *UGT1A4* en las diferentes poblaciones reportadas, revela una diferencia importante entre ellas. Hasta la fecha no hay información de estos polimorfismos en la población española, ni tampoco en la mexicana, altamente relacionadas por su origen ancestral, por lo que uno de los objetivos de esta tesis será determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de *UGT1A4*1b*, *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3* en estas dos poblaciones.

Tabla 4. Frecuencias (%) de las variantes alélicas de UGT1A4 en distintas poblaciones de estudio.

Población de estudio	n	Frecuencia alélica *UGT1A4*1b*	Frecuencia alélica *UGT1A4*2*	Frecuencia alélica *UGT1A4*3*	Referencias
Caucásicos	92	17.6	8.8	11.0	Thomas y cols., 2006
Alemanes	83	n.a.	8.0	9.0	Ehmer y cols., 2004
Franceses-Canadienses	254	20.9	4.9	8.3	Ménard y cols., 2009
Asiáticos	46	0	0	19.6	Thomas y cols., 2006
Japoneses	256	1.0	0	12.9	Saeki y cols., 2005
Japoneses	301	0	0	13	Saeki y cols., 2006
Japoneses	100	0	0	16.5	Mori y cols., 2005
Coreanos	50	0	0	12	Yea y cols., 2008
Jordanos	216	n.a.	6.5	3.5	Hazook y cols., 2012
Africanos	59	4	0	9.0	1000 Genomes Project.

n= número de individuos; **n.a.**= no analizado.

3.4. Relevancia clínica de los polimorfismos del gen *UGT1A4*

UGT1A4 es una de las principales enzimas implicadas en la N-glucuronidación de fámacos clínicamente importantes como son fenitoína, lamotrigina, olanzapina, tamoxifen, trifluoperazina, tacrolimus y amitriptilina, entre otros (Kubota y cols., 2007; Laverdière y cols., 2011; López y cols., 2011; Kaivosasaari y cols., 2011). Como se ha comentado, el gen *UGT1A4* es altamente polimórfico, siendo las variantes alélicas *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3* las que exhiben, hasta ahora, una mayor alteración sobre su actividad (Wiener y cols., 2004; Ehmer y cols., 2004). Se ha demostrado que polimorfismos en el gen *UGT1A4* (junto con *UGT1A1*) pueden ser la causa de las diferencias interindividuales en la O-glucuronidación de fenitoína en microsomas hepáticos humanos (Nakajima y cols., 2002).

También se ha observado una relación entre la variabilidad en la respuesta clínica y una disminución de la concentración sérica del antiepiléptico lamotrigina en pacientes que presentaban el alelo *UGT1A4*3* (Gulcebi y cols., 2011). En estudio *in vitro*, con enzimas recombinantes (UGT1A4 "wild-type",) se demostró que la presencia de estas, las variantes *UGT1A4 P24T* y *L48V*, pueden producir variaciones interindividuales en el metabolismo de lamotrigina (Zhou y cols., 2011). También se ha observado que ambos polimorfismos, *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*, están relacionados con la mayor aparición de efectos adversos inducidos por lamotrigina (Ghotbi y cols., 2010; Gulcebi y cols., 2011).

Se han obtenido, a partir de microsomas hepáticos humanos, resultados que sugieren que la variante alélica *UGT1A4*3* puede contribuir significativamente a una variabilidad interindividual en el metabolismo de olanzapina (Erickson-Ridout y cols., 2011; Haslemo y cols., 2012). En un estudio de asociación, el cambio de L48V en pacientes con esquizofrenia sugiere que este SNP está asociado con una disminución de la concentración del antipsicótico olanzapina en plasma (Ghotbi y cols., 2010; Erickson-Ridout y cols., 2011). Sin embargo, en otros estudios *in vitro*, utilizando como

sustrato otro antipsicótico como clozapina, la presencia de la variante *UGT1A4*3* aumentaba la actividad enzimática, desencadenando una mayor concentración de los metabolitos clz-5-N-glucorónido y dmclz-glucuronido en comparación con el "wild-type".

Con otros sustratos, en un estudio *in vitro* con 25-hidroxivitamina D_3 (biomarcador clínico para evaluar el estado de vitamina D), el genotipo *UGT1A4*3/*3* presentaba una mayor actividad de glucuronización que los "wild-type" (wt/wt) (Wang y cols., 2014).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que ambos polimorfismos *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3* afectan a la actividad metabólica de la enzima UGT1A4 *in vivo*, pudiendo ser los responsables de la variación en la respuesta clínica, o ser la causa de eventos adversos e intoxicaciones, que podían ser inducidas por fármacos metabolizados por la enzima UGT1A4, como lamotrigina u olanzapina (Ghotbi y cols., 2010; Gulcebi y cols., 2011).

Actualmente no existen casos reportados de pacientes que hayan sufrido reacciones adversas o intoxicaciones debidas a la administración concomitante de fármacos que sean metabolizados por la misma enzima UGT1A4. En un estudio realizado en pacientes en tratamiento con clozapina, risperidona u olanzapina, y en tratamiento concomitante con lamotrigina, a las dosis estandarizadas (100-200 mg/día durante 8 semanas), se observó que esta no afectaba a las concentraciones plasmáticas de clozapina o risperidona, y aunque se observó una ligera elevación de la concentración plasmática de olanzapina, esta no tenía significación clínica (Spina y cols., 2006).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS ..... - 44 -
2. OBJETIVO GENERAL ..... - 47 -
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... - 47 -

1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS

Debido a la implicación en el metabolismo de numerosos fármacos, las enzimas CYP2C9 (enzima de Fase I) y UGT1A4 (enzima de Fase II) son de gran interés por la influencia que pueda tener su variabilidad genética en la práctica clínica habitual.

Las frecuencias de las variantes alélicas del *CYP2C9* han sido previamente descritas en la población española, no así las frecuencias de *UGT1A4.* Recientemente se ha descrito un nuevo SNP intrónico (*IVS8-109A>T*) en el gen *CYP2C9* como influyente en la actividad de la enzima, habiendo sido testado, hasta la fecha, en un estudio con dos poblaciones de individuos diferentes donde se obtuvieron resultados discrepantes. En este estudio se utilizó losartán como fármaco-test para evaluar la actividad CYP2C9 (Hatta y cols., 2012). Sería de gran interés, determinar si esta mutación, al igual que otros polimorfismos del gen que la codifica, presenta diferencias interétnicas en su frecuencia. Para ello sería importante analizar las frecuencias alélicas y genotípicas existente en una población de voluntarios sanos española y compararlas con otras poblaciones de diferentes orígenes, principalmente poblaciones Iberoamericanas, ya que existe una notable diferencia en la frecuencia con la que se presentan los polimorfismos genéticos del *CYP2C9* en estas poblaciones (Dorado y cols., 2003c; 2012a; Llerena y cols., 2014). Así mismo se hace necesario reproducir los resultados previos de la potencial influencia de este SNP sobre el metabolismo de losartán (Hatta y cols., 2012) pero en otra población de diferente origen étnico.

En relación a la enzima de Fase II UGT1A4, no hay actualmente información sobre la frecuencia del polimorfismo genético del gen que codifica a esta enzima en la población española, lo cual es importante, puesto que se ha demostrado que variantes alélicas de este gen alteran la actividad de esta enzima implicada en el metabolismo de antiepilépticos como lamotrigina y otros fármacos de gran interés en la práctica clínica habitual, así como de diferentes compuestos endógenos como estrógenos y progestágenos.

Los trabajos de la presente Tesis Doctoral se han organizado en dos estudios principales:

Estudio I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109 A>T* del gen *CYP2C9* en poblaciones de España, Ecuador y Cuba.

Estudio II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético del gen*UGT1A4* en poblaciones de España y México.

1.1. ESTUDIO I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109 A>T* del *CYP2C9* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

En primer lugar, habría que desarrollar un método de detección genética eficaz, rápido, seguro y práctico y de bajo coste que sea de gran utilidad en la práctica clínica habitual. Este método, además, debe ir acompañado de un estudio de fenotipación para reforzar la influencia de SNP *IVS8-109 A>T* del gen *CYP2C9*, en la actividad de la enzima de Fase I del metabolismo a la que codifica.

Sabiendo el alto grado de polimorfismo del gen *CYP2C9* y de la variabilidad interétnica que presenta, es de interés el estudio de este SNP en poblaciones como la ecuatoriana y cubana, pues se utilizan para la comparación de las frecuencias genéticas con la población española.

Por otro lado, anteriormente se ha demostrado la influencia de los polimorfismos del gen *CYP2C9* sobre el IM de losartán /E-3174 en voluntarios sanos (Yasar y cols., 2002a; Dorado y cols., 2012a). Por tanto, sería de interés evaluar la potencial influencia de este nuevo SNP intrónico *IVS8-109 A>T* sobre la actividad enzimática CYP2C9 y poder replicar el estudio que se realizó previamente en una población de voluntarios sanos suecos y coreanos (Hatta y cols., 2012).

1.2. ESTUDIO II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* en las poblaciones de España y México

Actualmente, solo se conocen las frecuencias alélicas de los alelos de estudio (*UGT1A4*2* y *UGT1A4 *3*) en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas, mostrando diferencias importantes

entre ellas, pero aún no ha sido estudiada en poblaciones iberoamericanas, entre ellas la española. La población mexicana es un buen ejemplo de combinación de etnias con rasgos a su vez únicos y guarda una estrecha relación con la población española, debido a que movimientos migratorios de una y de otra población, son altamente frecuentes hoy en día.

Otra variante alélica del gen *UGT1A4* que muestra una notable heterogeneidad, y por tanto es de gran interés en el estudio de la variabilidad interétnica de este gen, es el alelo *UGT1A4*1b*. Aparece con alta frecuencia en europeos y americanos y con frecuencias bajas en las poblaciones asiáticas y africanas, pero se desconoce, por el momento, concretamente en las poblaciones iberoamericanas española y mexicana.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de la presente tesis fue determinar si existe variabilidad del gen *UGT1A4* y del SNP *IVS8-109A>T* del *CYP2C9* en la población española en comparación con otras poblaciones iberoamericanas (México, Ecuador y Cuba), así como verificar la potencial influencia de la variante *IVS8-109A>T* del *CYP2C9* sobre el metabolismo de losartán en voluntarios sanos.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. ESTUDIO I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109 A>T* del gen *CYP2C9* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

I.1. Desarrollar un método para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*.

I.2. Determinar la frecuencia alélica y genotípica de *CYP2C9 IVS8-109A>T* en una población española y su comparación con otras poblaciones de Ecuador y Cuba.

I.3. Evaluar la influencia del genotipo *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en una población de voluntarios sanos.

3.2. ESTUDIO II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* en las poblaciones de España y México

II.1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de *UGT1A4* en una población española.

II.2. Evaluar diferencias interétnicas en las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *UGT1A4* entre una población española y una de origen mestizo-mexicana.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO ..... - 49 -
2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN..... - 53 -
2.1. Examen Clínico..... - 53 -
2.2. Criterios de inclusión y exclusión..... - 53 -
2.3. Protocolos de estudio ..... - 54 -
3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS ..... - 55 -
3.1. Análisis del SNP *IVS8-109 A>T* del *CYP2C9*..... - 55 -
3.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4* ..... - 56 -
4. METODOLOGÍA ..... - 57 -
4.1. Análisis del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*..... - 57 -
4.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4* ..... - 60 -
*4.2.1. Detección de los alelos UGT1A4*1b* y **2* ..... - 60 -
*4.2.2. Detección del alelo UGT1A4*3* ..... - 61 -
4.3. Análisis de losartán y su metabolito en orina. ..... - 63 -
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS ..... - 64 -
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS ..... - 65 -

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para la realización de los diferentes estudios que componen este Trabajo de Tesis Doctoral, se han incluido una serie de muestras de diferentes estudios en voluntarios sanos, las cuales, se detallan a continuación con un resumen de las mismas en la Tabla 5.

Estudio I.1. Desarrollo de un método de PCR para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T*

Este estudio se realizó en un panel de 4 muestras seleccionadas procedentes de una población española previamente estudiada (Dorado y cols., 2003).

Estudio I.2. Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en una población española y su comparación con otras poblaciones de Ecuador y Cuba

Para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población española, se analizaron muestras de voluntarios sanos españoles (n=92; 47 hombres y 45 mujeres; edad: 18-57) previamente recogidas, anonimizadas y analizadas genotípicamente para los alelos *CYP2C9*2*, **3,*4*, **5* y **6* en un estudio previo (Dorado y cols., 2003). Estas muestras procedían de una población española, en su mayoría constituida por estudiantes y personal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura (Badajoz), todos ellos de origen europeos, residentes en esta comunidad.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población ecuatoriana se determinaron a partir de muestras de voluntarios sanos ecuatorianos (n=187; 77 hombres y 110 mujeres; edad: 18-48) constituidas por estudiantes de la Universidad Central del Ecuador en Quito, que fueron recogidas, anonimizadas y analizadas para los alelos *CYP2C9*2*, **3*, **4*, **5* y **6* en un estudio previo (Dorado y cols., 2012a).

Las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2C9 IVS8-109A>T* en la población cubana, se determinaron a partir de muestras de voluntarios sanos cubanos (n=213; 50 hombres y 163 mujeres; edad: 17-60), constituidas por estudiantes universitarios y trabajadores de la Escuela de Enfermería del Hospital Psiquiátrico de la Habana y la Facultad de Medicina "Calixto García", residentes en las provincias de La Habana y Ciudad Habana, que fueron recogidas, anonimizadas y analizadas para los alelos *CYP2C9*2,*3,*4,*5,*6* y **8* en el estudio previo de LLerena y cols., (2014). Dentro de la población cubana se hizo una distinción según el origen ancestral en: cubanos-caucásicos (n=105; 34 hombres y 71 mujeres; edad: 17-60) y cubanos-mestizos (n=108; 15 hombres y 93 mujeres; edad: 17-60), siendo clasificados estos últimos, por tener al menos un abuelo/a con origen africano.

Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* sobre la hidroxilación de losartán en una población de voluntarios sanos

Para el estudio de la influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en el IM de losartán, el polimorfismo de estudio fue determinado en 187 voluntarios sanos ecuatorianos no relacionados (77 hombres y 110 mujeres; edad: 18-48), participantes en un estudio previo (Dorado y cols., 2012a), donde se les había genotipado para los alelos *CYP2C9*2, *3, *4, *5* y **6* y fenotipados a dosis única oral de 25 mg de losartán, utilizando un método específico de HPLC para el análisis (Dorado y cols., 2012b). De estos 187 individuos, 161 (69 hombres y 92 mujeres; edad: 18-48) fueron seleccionados por presentar un genotipo *CYP2C9*1/*1* para el estudio de la relación entre este SNP y el índice metabólico de losartán. Estos fueron en su mayoría, estudiantes de la Universidad Central del Ecuador en Quito, los cuales proceden de diferentes regiones de Ecuador.

<u>Estudio II.1.</u> Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de *UGT1A4* en una población española

Para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de *UGT1A4* en la población española se escogieron muestras de voluntarios sanos no relacionados de origen caucásico español (n=318; 156 hombres y 162 mujeres; edad: 19-70). Estas muestras procedían de una población española, en su mayoría constituida por estudiantes y personal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura (Badajoz), todos ellos de origen europeos, residentes en esta comunidad autónoma.

<u>Estudio II.2.</u> Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de *UGT1A4* en una población mexicana-mestiza

Las frecuencias alélicas y genotípicas de *UGT1A4* en la población mexicana-mestiza se determinaron a partir de muestras de voluntarios sanos no relacionados de etnia mexicana-mestiza (n=248; 94 hombres y 154 mujeres; edad: 19-65), procedentes de la ciudad de México y áreas de alrededor.

Tabla 5. Muestras incluidas en los diferentes trabajos que componen la presente Tesis doctoral.

Estudio	Análisis genéticos realizados	Análisis previos	Número de muestras analizadas	Procedencia de las muestras
Desarrollo de un método de PCR para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T*	*CYP2C9 IVS8-109 A>T*	*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6*	4*	Estudio previo (Dorado y cols., 2003).
Frecuencias *CYP2C9 IVS8-109 A>T*en la población española	*CYP2C9 IVS8-109 A>T*	*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6*	92	Estudio previo (Dorado y cols., 2003)
Frecuencias *CYP2C9 IVS8-109 A>T*en la población ecuatoriana	*CYP2C9 IVS8-109 A>T*	*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6*	187	Estudio previo (Dorado y cols., 2012a)
Frecuencias *CYP2C9 IVS8-109 A>T*en la población cubana	*CYP2C9 IVS8-109 A>T*	*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6,*8*	213	Estudio previo (LLerena y cols., 2014)
Influencia del SNP *IVS8-109A>T* del *CYP2C9* sobre el IM de losartán	*CYP2C9 IVS8-109 A>T*	*CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6* Determinación de las concentraciones urinarias de losartán y E3174	161	Estudio previo (Dorado y cols., 2012a)
Frecuencias *UGT1A4* en una población española	*UGT1A4*1b, *2, *3*	……	318	Reclutamiento de voluntarios sanos
Frecuencias *UGT1A4* en una población mexicana-mestiza	*UGT1A4*1b, *2, *3*	……	248	Reclutamiento de Voluntarios sanos

IM= Índice metabólico; *****Muestras control para el desarrollo del método.

2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN

2.1. Examen Clínico

A los voluntarios sanos participantes en los distintos estudios de esta tesis, se les realizó en estudios previos, una historia clínica y farmacológica incluyendo antecedentes patológicos personales y familiares. También se tuvieron en cuenta hábitos de consumo de alcohol, tabaco y abusos de drogas, uso de plantas medicinales y de fármacos**.**

A todos los participantes de los estudios se les realizó, en su momento, un examen físico rutinario (Dorado y cols., 2003; 2012a; LLerena y cols., 2014). Este incluía exploración física, medición del peso, de la talla, la presión arterial y antecedentes, tanto personales como familiares, de enfermedades, alergias, etc. Todos estos datos, más la fecha y lugar de nacimiento, sexo, hábitos de consumo (tabaco, alcohol, cafeína) fueron recogidos en los protocolos confeccionados para cada uno de los estudios.

2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

a) Voluntarios sanos, sin alteraciones renales ni hepáticas.
b) Sujetos mayores de 18 años de edad.
c) Individuos sin relación de parentesco.
d) No estar bajo tratamiento farmacológico ni haber consumido hierbas medicinales en las dos últimas semanas anteriores al estudio.
e) No consumir fármacos de abuso, ni tener antecedentes de alcoholismo.
f) Firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

a) Historias clínicas con datos incompletos.
b) Individuos bajo tratamiento farmacológico.

c) Mujeres que confirman estar embarazadas o lo dudaban.

d) Personas que solicitaran revocar el consentimiento informado y/o que por algún motivo hayan tomado medicamentos, alcohol o algún alimento horas antes del estudio farmacocinético.

2.3. Protocolos de estudio

2.3.1. Estudio I. Variabilidad interétnica del SNP IVS8-109 A>T del gen CYP2C9 en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

La muestras de voluntarios sanos españoles también fueron recogidas, seleccionadas, anonimizadas y analizadas para otros fines en el estudio previo (Dorado y cols., 2003). El proceso anterior al realizado en el Estudio I.2. fue la extracción de 10 ml de sangre, almacenamiento y extracción de ADN. En este caso, solo se procedió al análisis de detección del SNP de estudio correspondiente.

Las muestras procedentes de la población ecuatoriana y cubana fueron recogidas, seleccionadas, anonimizadas y analizadas para otros fines en los estudios previos (Dorado y cols., 2012a; Llerena y cols., 2014). Dichas muestras también siguieron el mismo protocolo de extracción de sangre, almacenamiento, extracción de ADN y análisis de detección de los diferentes SNPs del *CYP2C9*.

Para el estudio de la influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* sobre el IM de losartán se analizaron muestras de una población ecuatoriana recogidas, seleccionadas, anonimizadas (Dorado y cols., 2012a). La extracción de la muestra se realizó a partir de 10 ml de sangre venosa en un tubo EDTA (Vacutainer®, BD, EEUU) previamente etiquetado con su número de protocolo. Posteriormente, 2 ml de sangre de cada muestra fueron transferidos a microtubos rotulados que se almacenaron a -20ºC hasta el momento de su utilización, para la extracción de ADN genómico mediante el kit de extracción QIAamp®, ADN blood (QIAGEN, Hildesheim, Alemania).

La secuencia del gen *CYP2C9* de referencia para la amplificación del SNP fue obtenida de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Secuencia de Referencia NCBI:

NG_008385.1:*55081 A>T*). La determinación del tamaño del amplicón (49925-50546 pb) y la verificación de la especificidad de los primers se obtuvo mediante las herramientas BLAST, ofrecidas por el programa de esta misma página web (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Para comprobar que el fragmento resultante de la amplificación era el buscado, se utilizó el programa Nebcutter (http://tools.neb.com/NEBcutter2/).

2.3.2. Estudio II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de UGT1A4 en las poblaciones de España y México

En el estudio de la frecuencia genotípica del gen *UGT1A4* en la población española y en la población mexicana-mestiza, respectivamente, se recogieron, seleccionaron y anonimizaron muestras de voluntarios sanos no relacionados españoles, procedentes de Extremadura y mexicana-mestiza, procedente de la ciudad de México y alrededores. Una vez recogidas, cada una de ellas fueron almacenadas en condiciones de -20ºC hasta la extracción de ADN. Las técnicas de PCR a tiempo real (PCR-RT) y PCR-RFLP fueron empleadas para genotipar las diferentes variantes alélicas *UGT1A4*1b, UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*. La nomenclatura de las tres variantes alélicas analizadas estuvo de acuerdo con la página oficial de nomenclatura oficial de UGT (http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A4.htm).

3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS

3.1. Análisis del SNP *IVS8-109 A>T* del *CYP2C9*

El ADN genómico de las muestras fue aislado usando el kit de extracción QIAamp®, ADN blood (QIAGEN, Hildesheim, Alemania). La cuantificación y calidad del ADN se realizó en el espectofotómetro de UV, modelo Nanodrop 2000, (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU).

Los análisis de amplificación se efectuaron mediante el uso de un termociclador modelo Mastercycler® 384 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Las PCR se realizaron con la enzima EcoTaq polimerasa 5U/µl (Ecogen, Barcelona, España), dNTPs de Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade (Roche Diagnostics, GmbH, Alemania) y diferentes oligonucleótidos (Tabla 6), adquiridos a EcoGen (Madrid/Barcelona, España). Las digestiones fueron con la enzima de restricción *Hinf I* (New England Biolabs, Herts, Reino Unido).

Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Nsi I*, *Msp I* y *Pst I* (New England Biolabs, Herts, Reino Unido) y las digestiones con cada una de ellas se incubaron en el termociclador Mastercycler® gradient 5333 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

La agarosa utilizada para la elaboración de geles fue de Pronadisa (Madrid, España), la tinción se llevó acabó con bromuro de etidio 10 µg/ml (Sigma S.A., Madrid, España) y la visualización de los resultados finales tras la electroforesis se hizo en un transiluminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4*

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante el kit QIAamp® (QIAGEN, Hildesheim, Alemania). La cuantificación y calidad del ADN se realizó en el espectofotómetro de UV, modelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU).

Los alelos *UGT1A4*2* (70C>A; P24T) (rs6755571) y *UGT1A4*1b* (471C>T; C157C) (rs2011404) fueron genotipados con los ensayos disponibles comercialmente de TaqMan (C_25957120_10 y C_8739217_10, respectivamente) para sistemas Applied Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, Massachusetts, USA). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del equipo de PCR a tiempo real AB7300. La discriminación alélica para identificar los genotipos individuales se realizó mediante un software v2.0 de Applied Biosystems. Para determinar la variante alélica *UGT1A4*3* (*142T>C*; L48V) (rs2011425) se realizó una PCR-RFLP (PCR-

restriction fragment lenght polymorphism) con la enzima de restricción *Stu I* (Roche, Barcelona, España) con primers ya publicados (Ehmer y cols., 2004; Ghotbi y cols., 2010).

4. METODOLOGÍA

4.1. Análisis del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*

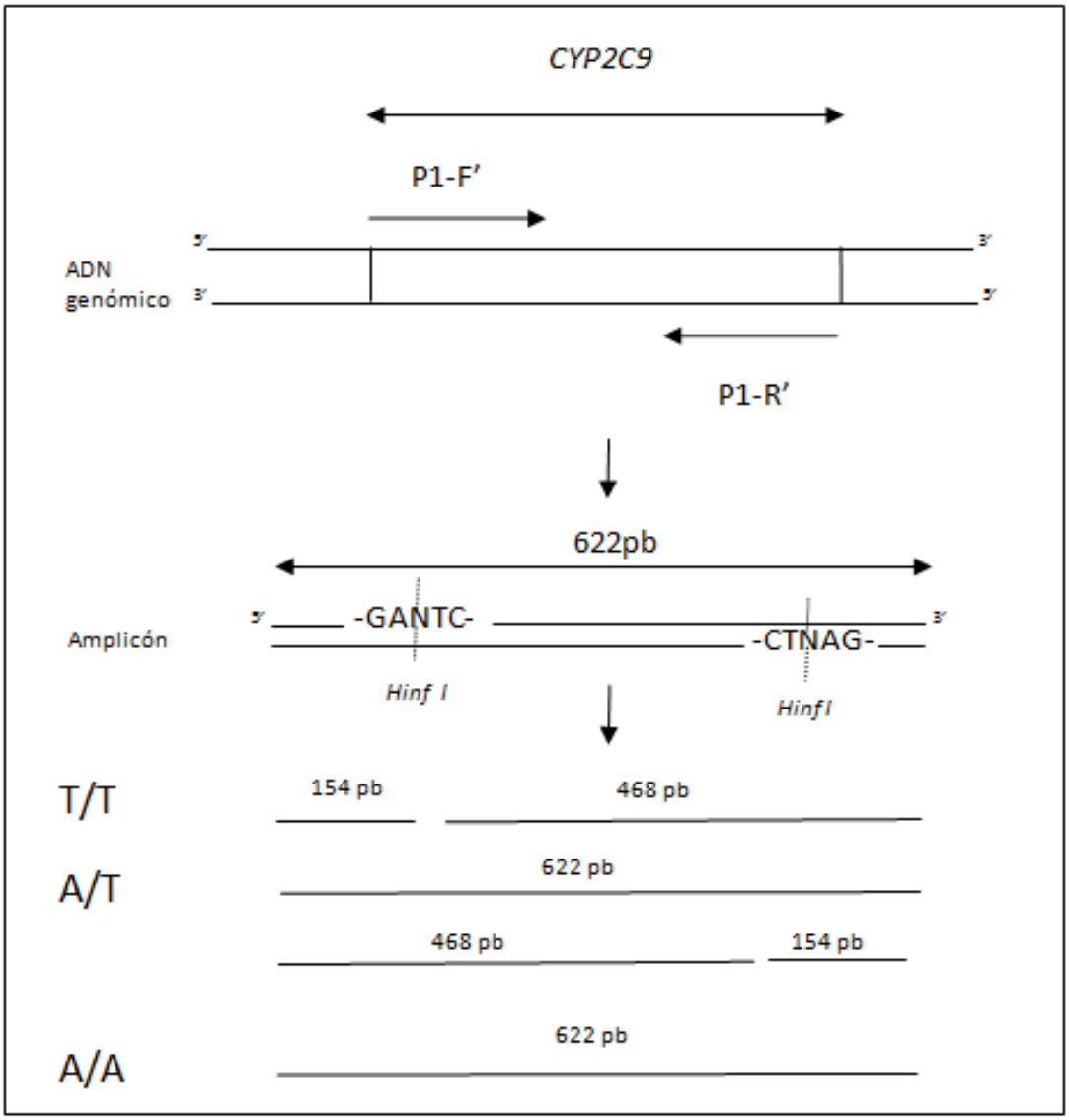
Para determinar si los individuos presentaban en su genoma el SNP de estudio, se procedió a realizar una PCR-RFLP. La amplificación de 50 a 100 ng/µl de ADN genómico humano se realizó añadiendo 0.5U EcoTaq polimerasa (Ecogen, Barcelona, España), 1µl de ADN genómico, 0.8 µM de cada uno de los primers (Tabla 6), 0.2 mM de dNTPs mix (Deoxynucleoside Trisphosphate Set PCR; Roche Diagnostics GmbH), 2mM de $MgCl_2$ (Ecogen), 2.5 µl de 10x PCR buffer (sin Mg, Ecogen) y agua hasta completar un volumen total de 25 µl.

Tabla6. Secuencias de los primers utilizados para genotipar el CYP2C9 *IVS8-109 A>T*.

Primer	Secuencia (5´-3´)
2C9SNP8-F´	CTGTTAAGATCTGATATTAGG
2C9SNP8-R´	TGAAACATAGGAAACTCTCCG

El análisis consistió, en una primera fase, donde se realizaba una amplificación de un fragmento de 622 pb, de dirección 5´-3´, situado en el intrón 8 del gen *CYP2C9*, mediante una PCR, seguida de una segunda fase, en la que el producto resultante de la amplificación anterior se incuba con la enzima de restricción *Hinf I*, que reconoce la secuencia 5´-GANTC-3´, dentro del fragmento de 622 pb, en la posición 154 pb y corta en el tercer nucleótido del extremo 5´, dando lugar a fragmentos de 468 pb + 154 pb en individuos con genotipo homocigoto mutante (*T/T*), fragmentos de 622 pb + 468 pb + 154 pb en individuos heterocigotos (*A/T*) y un único fragmento de 622 pb en individuos homocigotos “wild-type” (*A/A*) donde no se ha producido el corte (Figura 3).

Figura 3. Esquema del análisis de amplificación del SNP *IVS8-109A>T* del gen *CYP2C9* a partir de los oligonucleótidos específicos, mediante PCR-RFLP.



Oligonucleótidos específicos: P1-F' y P1-R'. Fragmentos resultantes de la digestión con la enzima de restricción *Hinf* I.

Las condiciones de temperatura y tiempos de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95ºC durante 8 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95ºC durante 30s, anillamiento a 54ºC durante 30s y 72ºC durante 30s, con una extensión final de 7 min a 72ºC. La reacción de PCR generó un fragmento de 622 pb.

En la confirmación del amplicón resultante de la PCR convencional se procedió a llevar a cabo tres digestiones, con diferentes enzimas de restricción, cuyos puntos de corte en el fragmento buscado eran conocidos.

Digestión con la enzima *Nsi I*

La enzima de restricción *Nsi I*, de un solo corte, corta en el sitio 115 nucleótido (nt) en dirección 5´-3´ y 111 nt en dirección 3´-5´ en el fragmento de 622 pb buscado. Los fragmentos resultantes de la digestión serán 115-111 pb + 507-511 pb. Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

En un volumen total de 20 µl se incluyen: 5 U de *Nsi I* (New England Biolabs, Herts, Reino Unido), 1 µl de producto resultante de la PCR, 2 µl de 10 x buffer 10 y el volumen restante de aguaMilli-Q. La incubación tuvo una duración de 14 horas a 37ºC en el termociclador modelo Mastercycler® gradient 384 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Digestión con la enzima *Msp I*

La enzima de restricción *Msp I*, de un solo corte, corta en el sitio 296 nt en dirección5´- 3´ y 298 nt en dirección 3´- 5´ en el fragmento de 622 pb buscado. Los fragmentos resultantes de la digestión serán 296-298 pb + 326-324 pb. Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

En un volumen total de 20 µl se incluyen 7.5 U de enzima de restricción, 1 µl de producto resultante de la PCR, 2 µl de 10 x buffer y el resto de agua Milli-Q. La incubación tuvo lugar durante 14 horas a 37 ºC en el termociclador modelo Mastercycler® gradient 384 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Digestión con la enzima *Pst I*

La enzima de restricción *Pst I*, de un solo corte, corta en el sitio 488 nt en dirección 5´- 3´ y 484 nt en dirección 3´- 5´en el fragmento de 622 pb buscado. Los fragmentos resultantes de la digestión serán 484-489 pb + 138-133 pb. Las condiciones de incubación fueron las siguientes:

En un volumen total de 20 µl se incluye 10 U de enzima de restricción, 1 µl de producto resultante de la PCR, 2 µl de 10 x buffer, 0.2 µl de BSA y el resto de agua Milli-Q.

La incubación tuvo lugar durante 14 horas a 37ºC en el Termociclador modelo Mastercycler® gradient 384 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

La visualización de las bandas resultantes de cada una de las digestiones se llevó a cabo en un gel al 2 % de agarosa a partir de 12 µl de producto de cada una de ellas, junto con 2 µl de producto de PCR sin digerir. Para la visualización de la banda resultante sin digerir (622 pb) y las procesadas con las diferentes enzimas de restricción, anteriormente especificadas, se añadió 10 µl de EtBr y se cargó como marcador para el tamaño de banda 4 µl de Hyperladder IV (100-1000 pb).

Tras el resultado obtenido en cada una de las digestiones anteriores, en las que se confirmaba que el fragmento amplificado de 622 pb resultante de la primera PCR era el deseado, se procedió a tratar con la enzima de restricción *Hinf I,* la cual detecta y corta cuando la base mutada (A>T) está presente en el amplicón.

La mezcla para la digestión con la enzima de restricción *Hinf I* se componía de un volumen total de 20 µl que incluía 10 U de dicha enzima (New England Biolabs, Herts, Reino Unido), 2 µl de producto resultante de la PCR-convencional anterior, 2 µl de 10 x buffer que se proporcionaba con la enzima (7 mM $MgCl_2$) y el resto de agua.

Las condiciones de incubación fueron de 37ºC durante 9 horas en un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, CA, EEUU).

Tanto el producto de la PCR como los fragmentos resultantes de la digestión se sometieron a electroforesis mediante un gel de agarosa al 2 % y la visualización se llevó a cabo con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

4.2. Análisis de los genotipos de *UGT1A4*

*4.2.1. Detección de los alelos UGT1A4*1b* y *2*

La determinación de las variantes alélicas *UGT1A4*1b* y *UGT1A4*2* se realizó mediante una PCR a tiempo real (PCR-RT). Para cada SNP se utilizó un kit de reactivos con ensayos TaqMan

prediseñados, que contienen un par de primers y un par de sondas Taqman (Applied Biosystems, Forster City, CA, EE.UU.) con fluorescencia (Tabla 7).

Tabla 7. Sondas TaqMan empleadas para la determinación de las variantes alélicas de estudio.

Variante	dbSNP ID	Assay ID
*UGT1A4*1b*	rs2011404	C_25957120_10
*UGT1A4*2*	rs6755571	C_8739217_10

dbSNP ID = database Single Nucleotid Polimorphism identification;
Assay ID = Assay identification.

La reacción de amplificación se realizó en 20 µl con 30 ng de ADN humano molde, 1x de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Forster City, CA, EE.UU.), 1x de cada primer y sondas y agua. Las condiciones iniciales fueron un primer paso de desnaturalización de 10 min a 95ºC, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 92ºC de 15 segundos y una fase de alineación a 60ºC durante 1 min. El proceso de discriminación alélicas se llevó a cabo en el último paso de 1 min a 60ºC.

Todas las reacciones de PCR se dieron en una placa de 96 pocillos en la que en tres de sus pocillos se pipetearon un control negativo (sin ADN) y controles positivos (homocigotos y heterocigotos conocidos).

*4.2.2. Detección del alelo UGT1A4*3*

Para determinar si los individuos llevaban la variante alélica 142T>G; L48V (*UGT1A4*3)* se realizó una PCR-RFLP. Dicha técnica se compone de una amplificación por PCR convencional, seguido de una digestión, en este caso con la enzima de restricción *Stu I.*

La amplificación de 50-100 ng/µl de ADN genómico se dio en un volumen de 25 µl de mezcla que contenía 5U/nl EcoTaq polymerase (Ecogen, Barcelona, España), 2.5 µl de PCR Buffer 10x,50 mM

de $MgCl_2$, 100 mM de dNTPs y 100 pmol/n de cada uno de los primers, ya publicados. (Ehmer y cols., 2004; Ghotbi y cols., 2010) (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR para la determinación de la variante alélica *UGT1A4*3*.

Primer	Secuencias (5´-3´)
Forward primer	GTTGGGCCCATAACGAAAGGCAGTT
Reverse primer	GCTCCACACAACACCTATGAAG

Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: una fase de desnaturalización a 94ºC durante 5 min, 35 ciclos a 1min 94ºC, 1min 30s a 59ºC, 30s a 72ºC y una fase final de elongación a 68ºC durante 7 min.

El producto resultante de la PCR, fragmento de 576 pb, fue visualizado en un gel de 2% de agarosa, mediante electroforesis y posteriormente fue digerido con la enzima de restricción *Stu I* (10 U/nl), con su respectivo buffer, en un volumen total de 20 µl y en el que se incluía 4 µl de producto de PCR. La incubación con la enzima tuvo lugar toda una noche a 37ºC en un termociclador modelo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (California, EE.UU.), el mismo utilizado para la PCR.

Los productos resultantes de la digestión fueron analizados directamente en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio tras una electroforesis. La relación entre el genotipo y los tamaños de banda resultante de la digestión está indicada en la Tabla 9.

Tabla 9. Relación entre genotipo y tamaño de banda resultante de la digestión con la enzima *Stu I*.

Genotipo	Tamaño de banda resultante
wt/wt (T/T)	324 pb+252 pb
wt/mut (T/G)	324 pb+252 pb+576 pb
mut/mut (G/G)	576 pb

wt (T)= variante wild type (timina); **mut (G)**=variante mutante (guanina); **pb**= pares de bases.

Seguidamente, cada variante alélica, fue confirmada directamente por secuenciación en un 5% de las muestras. Los oligonucleótidos y las condiciones de secuenciación fueron las publicadas por Saeki y cols., 2005, la purificación de los amplicones fue secuenciada con el Termociclador Big Dye v3.1, el Kit Cycle Sequencing y separado en un analizador genético AB3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, Masachusetts, EE.UU.).

Todas las secuencias fueron analizadas mediante Sequencing Analysis v5.3 y todas las variantes alélicas fueron confirmadas por secuenciación de los productos de una PCR independiente en ambas cadenas y se verificó con diferentes bases de datos publicadas. La nomenclatura y posición de los diversos polimorfismos identificados son relativas a la adenina (+1) de la secuencia de referencia ATG de NM_007120.2 a NP_009051.1.

4.3. Análisis de losartán y su metabolito en orina.

El análisis de losartán y su metabolito E-3174 en orina fue el realizado por HPLC en estudios previos (Dorado y cols., 2012a; 2012b). A continuación se detalla brevemente el procedimiento de análisis de las muestras.

Se partió de una alícuota de 1 mL de orina humana que se añadió a un tubo de polipropileno de 10 mL. A continuación a este tubo se le añadió 200 µl de una solución de metanol con composición de agua (50:50, v/v) y 5 mL de MTBE (métil tert butil éter). La mezcla fue agitada en vórtex durante 30 segundos y después centrifugada a 1400 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. La muestra después de la centrifugación se sometió a congelación y tras este proceso, la fase orgánica se transfirió a un tubo de polipropileno nuevo. Este tubo se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno y el residuo fue reconstituido con 200 µl de fase móvil. Finalmente, una solución de 50 µl fue inyectada en el sistema cromatográfico.

Las concentraciones de losartán y E-3174 en orina fueron determinadas mediante HPLC con detección por fluorescencia. El sistema de cromatografía líquida utilizado (Beckman-Coulter, Palo

Alto, CA, EE.UU.) estaba compuesto por una bomba de solvente (modelo System Gold 118), una válvula de inyección Rheodyne (modelo 7725i) y un detector UV (modelo 166). El cromatograma estaba acoplado a un sistema modular de detección por fluorescencia de Jasco (model FP-2020, Tokio, Japón) equipado con una célula de flujo de fluorescencia directamente conectada a la excitación y emisión de guías de luz. El detector también estaba equipado con una lámpara de xenón, como fuente de irradiación (potencia 150w), con un espectro de radiación entre 220 y 700 nm e incluye un detector fotomultiplicador que trabaja en un espectro de 220-700 nm. Los datos fueron recopilados y el equipo fue controlado usando el software Beckman 32 Karat v7.0. Los resultados se obtuvieron usando una columna modificada con grupos fenilo, de 250 mm x4.6 mm y 5µm de tamaño de partícula (Advanced Chromatography Technologies Phenyl, Aberdeen, Escocia, Reino Unido). Adicionalmente, una precolumna (10 x 3 mm y 5µm de tamaño de partícula; ACE Phenyl) se situó antes de la columna de cromatografía para retener las impurezas y mejorar la selectividad del método.

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los estudios fueron realizados de acuerdo a las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptados en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, junio de 1964) y revisados por la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, (octubre de 2008).

Antes de la realización de las pruebas, cada uno de los sujetos, fueron informados verbalmente y por escrito acerca de los objetivos, protocolos y características de los estudios. Todos ellos dieron su consentimiento por escrito anteriormente a su participación en los mismos.

5.1. Estudio I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109A>T* del gen *CYP2C9* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

Los estudios previos fueron aprobados por el Comité de Bioética e Investigación de la Universidad Central del Ecuador, el Comité Ético de Investigación de la Facultad de Medicina ¨Calixto García" (Habana, Cuba), la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España) y por el Comité de Ética del Hospital Universitario "Infanta Cristina" de Extremadura (Badajoz, España).

5.2. Estudio II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* en las poblaciones de España y México

El estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España), por el Comité de Ética del Hospital Universitario "Infanta Cristina" de Extremadura (Badajoz, España) y por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) (Ciudad de México, México).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa informático GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). En los diferentes estudios de esta Tesis un p-valor menor de 0.05 se tomó como estadísticamente significativo.

6.1. Estudio I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109A>T* del gen *CYP2C9* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

Las frecuencias alélicas y genotípicas en las distintas poblaciones de estudio fueron evaluadas siguiendo la ley de equilibrio de una población Hardy-Weinberg, usando una tabla de contingencia χ^2 con corrección de Yates´s. Y para contrastar las posibles diferencias, estadísticamente

significativas, entre las frecuencias alélicas en las poblaciones de estudio con otras de la literatura, se llevó a cabo mediante un test exacto de Fisher.

La determinación de las diferencias entre los IM de todos los grupos de genotipos, para la mutación *CYP2C9 IVS8-109A>T* (*A/A, A/T, T/T*) en el gen *CYP2C9*, obtenidos con el fármaco-test losartán, se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) mediante el *test de Kruskal-Wallis*. Y con el fin de esclarecer entre que grupos de genotipos concretamente existían diferencias estadísticamente significativas, se hizo un test no paramétrico Mann-Whitney.

6.2. Estudio II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* en las poblaciones de España y México

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron evaluadas siguiendo la ley de equilibrio de una población Hardy-Weinberg, mediante una tabla de contingencia χ^2, con corrección de Yates´s. Para determinar las posibles diferencias en las frecuencias alélicas entre la población de estudio con otras poblaciones, se realizó mediante el test de Fisher.

El análisis de haplotipos y de desequilibrio de ligamiento fue realizado usando el software Haploview, version 4.0. Los haplotipos fueron deducidos de los genotipos individuales usando el software PHASE v2.1. Las condiciones empleadas para deducir el haplotipo usando 3 SNPs bialélicos consistían en 100 interacciones y 5 intervalos pasando a través de la cadena Markov.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP *IVS8-109A>T* DEL GEN *CYP2C9* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA ..... - 68 -
1.1. Estudio I.1. Desarrollo de método para la determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* - 68 -
1.2. Estudio I.2. Determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* en la población española y diferencias interétnicas..... - 71 -
1.2.1. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población española* ..... - 71 -
1.2.2. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población ecuatoriana*..... - 72 -
1.2.3. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-caucásica*..... - 72 -
1.2.4. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-mestiza*..... - 73 -
1.2.5. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en otras poblaciones* ..... - 74 -
1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos..... - 76 -
2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE *UGT1A4* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO ..... - 77 -
2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas..... - 77 -
2.1.1. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población española ..... - 77 -
2.1.2. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población mexicana-mestiza..... - 78 -
2.1.3. Frecuencia salélicas del gen UGT1A4 en otras poblaciones..... - 80 -

1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP *IVS8-109 A>T* DEL GEN *CYP2C9* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA

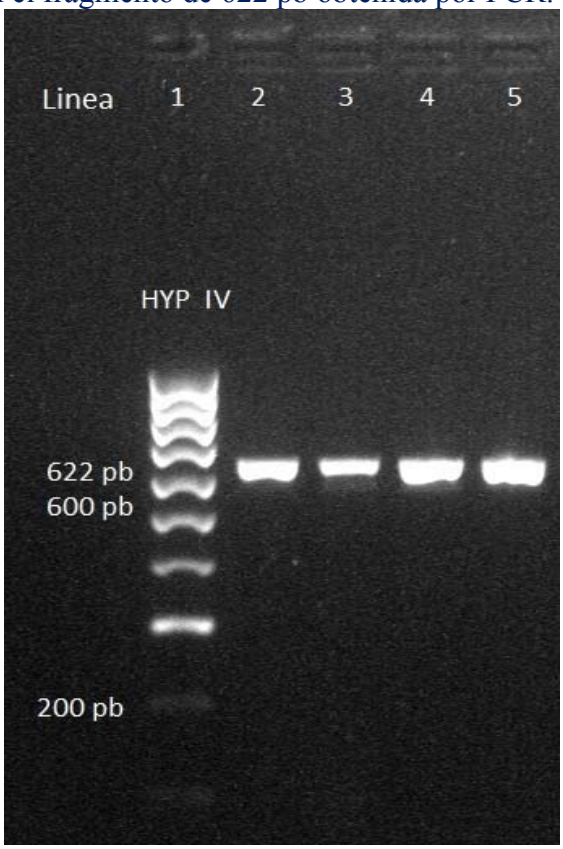
Para determinar la frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba, así como su implicación funcional sobre la actividad metabólica de CYP2C9, se procedió a la realización de diferentes trabajos. En primer lugar se desarrolló un nuevo método de PCR-RFLP para el análisis del SNP de estudio (I.1), posteriormente se determinaron las frecuencias alélicas de dicho SNP en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba (I.2) y finalmente se estudió la influencia de dicho SNP sobre la actividad hidroxiladora de CYP2C9, evaluada mediante el índice losartán/E-3174 (I.3).

1.1. Estudio I.1. Desarrollo de un método para la determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T*

Para la detección del SNP *IVS8-109 A>T* en el gen *CYP2C9* se desarrolló un nuevo método de PCR-RFLP adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio, que consistió en una PCR seguida de una digestión con la enzima de restricción *Hinf I*, en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos de la presente Tesis.

La Figura 4 muestra una electoforesis con las bandas resultantes de la amplificación por PCR del fragmento de 622 pb, situado en el gen *CYP2C9*, usando los oligonucleótidos descritos anteriormente (Tabla 6).

Figura 4. Electroforesis con el fragmento de 622 pb obtenida por PCR.

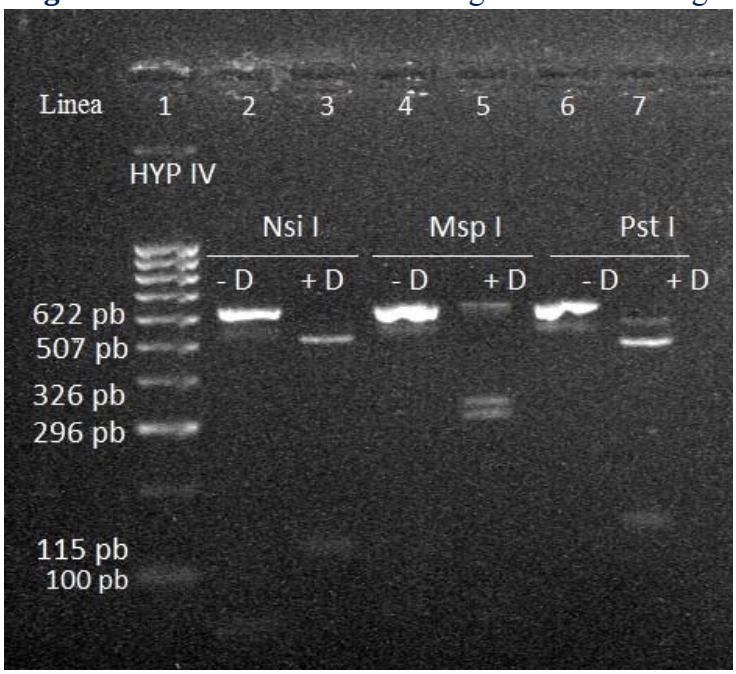


Línea 1: marcador de tamaño de pares de bases (pb) conocido (100pb). **Líneas 2-5**: bandas de 622 pb.

Tras la amplificación, las distintas digestiones con las enzimas de restricción *Nsi I*, *Msp I* y *Pst I* confirmaron que el amplicón de 622 pb obtenido, fue el esperado. El objetivo de estas digestiones era corroborar el fragmento amplificado y el tamaño de banda en la PCR, que posteriormente se trataría con la enzima de restricción *Hinf I*. Estas tres enzimas de restricción (*Nsi I, Msp I y Pst I*) cortaban en un único sitio en cada cadena, en sus nucleótidos respectivos (*Nsi I* en el nt 115 en la cadena 5'-3' y en el nt 111 en la cadena 3'-5'; *Msp I* en el nt 296 en la cadena 5'-3' y en el nt 298 en la cadena 3'-5'; *Pst I* en el nt 488 en la cadena 5'-3' y en el nt 484 en la cadena 3´-5´) e indistintamente en la cadena "wild-type", que en la cadena mutante, es decir, en los sitios anteriormente señalados, según la dirección de lectura de la cadena, reconociendo y cortando tanto a la cadena con el nt *A* en la posición -109 del gen *CYP2C9,* como a la cadena con el nucelótido *T* en la posición -109 del gen *CYP2C9.* Este hecho permite asegurar que la digestión se ha completado.

El corte con la enzima de restricción *Nsi I* genera dos bandas, una de un tamaño comprendido entre 115-111 pb y otra banda con un tamaño entre 507-511 pb. El corte con *Msp I* genera una banda de un tamaño entre 296-298 pb y otra banda de entre 326-324 pb. El corte con la enzima de restricción *Pst I* genera dos bandas, una banda de tamaño comprendido entre 484-489 pb y una segunda banda de entre 138-133 pb. La ausencia de corte con cualquiera de las tres enzimas da lugar a una banda de tamaño de 622 pb. En la Figura 5 se muestra una electroforesis donde se observan las bandas resultantes de los cortes de cada una de las enzimas para el reconocimiento del fragmento.

Figura 5. Electroforesis con los fragmentos de las digestiones por *Nsi I*, *Msp I* y *Pst I*.

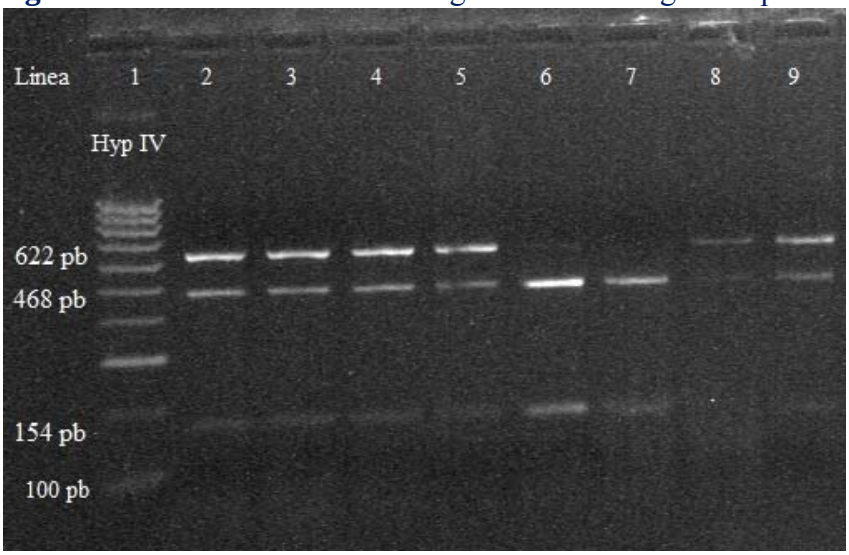


Línea 1: marcador de tamaño de pares de bases (pb) conocido (100pb). **Línea 2, 4, 6:** Fragmento no sometido a digestión por las enzimas *Nsi I*, *Msp I* y *Pst I* respectivamente. **Línea 3:** bandas de 507 pb +115 pb resultantes de la digestión del producto de la PCR convencional con la enzima *Nsi I*. **Línea 5:** bandas de 326 pb + 296 pb resultantes de la digestión con la enzima *Msp I*. **Línea 7:** bandas de484 pb + 138 pb resultantes de la digestión con la enzima *Pst I*. **Línea 5 y 7:** aparecen bandas de 622 pb inespecíficas debido a una digestión parcial con las enzimas *Msp I* y *Pst I* respectivamente del fragmento del mismo tamaño.

Los resultados obtenidos con la enzima de restricción *Hinf* I, pudieron determinar la presencia de este SNP cortando la banda de 622 pb en dos fragmentos de 154 y 468pb. Esta enzima de restricción, al igual que *Nsi I*, *Msp I* y *Pst I*, era de un solo corte, reconociendo la secuencia 5'-GA*N*TC-3' dentro del fragmento de 622pb y cortando en el tercer nt del extremo 5' de esta secuencia, concretamente en el nt 154, pero solo cortaba en la cadena que llevaba el nt "wild-

type"(*A*), lo que a diferencia de las anteriores enzimas de restricción, nos permite diferenciar la cadena "wild-type" (sin corte) de la mutante, pudiendo así definir el genotipo del individuo. En la Figura 6 se muestra las bandas resultantes de la digestión con la enzima de restricción comentada.

Figura 6. Electroforesis con los fragmentos de la digestión por *Hinf I*.



Línea 1: marcador de tamaño de pares de bases (pb) conocido (100pb).
Línea 2-5: muestras con genotipo *wt/mut* (622+468+154pb). **Línea 6-7:** muestras con genotipo *mut/mut* (468+154 pb). **Línea 8**: muestra con genotipo *wt/wt* (622pb). **Línea 9:** muestra con genotipo wt/mut (622+468+154pb).

1.2. Estudio I.2. Determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población española y diferencias interétnicas

1.2.1. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en una población española*

Las frecuencias de los distintos genotipos para el SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población española (n=92) se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado, p>0.05), donde el genotipo más común fue *CYP2C9 IVS8-109 A/T* (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* en una población de voluntarios sanos de España (n=92).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
CYP2C9 IVS8-109 A/A	35	0.380	0.287-0.482	0.384
CYP2C9 IVS8-109 A/T	44	0.478	0.379-0.579	0.472
CYP2C9 IVS8-109 T/T	13	0.141	0.083-0.228	0.144

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=1.00).

La frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 T* en la población española fue de 0.38 (95% IC =0.313-0.452; Tabla 14).

1.2.2. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en una población ecuatoriana*

Las frecuencias de los distintos genotipos para el SNP *IVS8-109 A>T* en la población de voluntarios sanos ecuatorianos (n=187) se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado, p>0.05) donde, a diferencia de las frecuencias genotípicas encontradas en la población española, el genotipo más común en la población ecuatoriana fue *CYP2C9 IVS8-109 A/A* (Tabla 11). La frecuencia del SNP *IVS8-109 T* en esta población fue de 0.214 (95% IC=0.175-0.258; Tabla 14), siendo menor que la encontrada para este SNP en la población de voluntarios sanos españoles (p<0.05).

Tabla 11. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109 A/T* en una población de voluntarios sanos de Ecuador (n=187).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
CYP2C9 IVS8-109 A/A	115	0.615	0.543-0.682	0.618
CYP2C9 IVS8-109 A/T	64	0.342	0.278-0.413	0.336
CYP2C9 IVS8-109 T/T	8	0.043	0.020-0.083	0.046

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=1.00).

1.2.3. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-caucásica*

Las frecuencias de los distintos genotipos para este SNP en la población de voluntarios sanos cubanos con origen caucásico (n=105), se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado, p>0.05) donde, al igual que las frecuencias genotípicas encontradas en la población ecuatoriana, el genotipo más común en la población cubana-caucásica fue *CYP2C9 IVS8-109 A/A* (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109 A/T* en una población de voluntarios sanos cubana-caucásica (n=105).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
CYP2C9 IVS8-109 A/A	48	0.457	0.365-0.552	0.464
CYP2C9 IVS8-109 A/T	47	0.448	0.356-0.543	0.434
CYP2C9 IVS8-109 T/T	10	0.095	0.051-0.168	0.102

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=0.9047).

La frecuencia del SNP *IVS8-109 T* en esta población fue de 0.320 (95% IC=0.260-0.385; Tabla 14), similar a la encontrada para este SNP en la población de voluntarios sanos españoles.

1.2.4. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T en una población cubana-mestiza*

Las frecuencias de los distintos genotipos para este SNP en la población de voluntarios sanos cubanos con mezcla de orígenes africanos e hispánicos (n=108), se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado, p>0.05) donde, en esta población, sin embargo, el genotipo más frecuente fue *CYP2C9 IVS8-109 A/T*, similar a la población española (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109 A/T* en una población de voluntarios sanos cubana-mestiza (n=108).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
CYP2C9 IVS8-109 A/A	32	0.296	0.218-0.388	0.269
CYP2C9 IVS8-109 A/T	48	0.444	0.354-0.538	0.499
CYP2C9 IVS8-109 T/T	28	0.259	0.185-0.350	0.232

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=0.5125).

La frecuencia del SNP *IVS8-109 T* en esta población fue de 0.481 (95% IC=0.416-0.548; Tabla 14), superior a la encontrada para este SNP en la población española.

1.2.5. Frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T en otras poblaciones*

Al compararlas frecuencias del *SNP CYP2C9 IVS8-109 T* y las de sus posibles genotipos en la población de voluntarios sanos españoles con la población de voluntarios sanos ecuatorianos, cubana de origen caucásico, cubana-mestiza y resto de poblaciones previamente estudiadas en la literatura, se observó que las genotipos más frecuentes en cada una de estas poblaciones fueron: *CYP2C9 IVS8-109 A/A* en la población ecuatoriana de estudio, sueca y cubana-caucásica de estudio respectivamente, *CYP2C9 IVS8-109 A/T* en la población japonesa, española de estudio, coreana y cubana-mestiza de estudio respectivamente. Dicha mutación aparecía en una mayor frecuencia en la población cubana–mestiza (0.481;95%IC=0.416-0.548) y japonesa (0.456;95%IC=0.414-0.499) frente a las poblaciones española de estudio (0.380;95%IC=0.313-0.452), asiática coreana (0.371;95%IC=0.314-0.432), caucásica cubana (0.320;95%IC=0.260-0.385) y sueca (0.318; 95% IC=0.252-0.391) y la ecuatoriana (0.214; 95% IC=0.175-0.258), respectivamente (Tabla 14).

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas del SNP *IVS8-109A>T* entre las diferentes poblaciones de estudio (Tabla 15).

Tabla 14. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población de voluntarios sanos españoles (n=92) con otras poblaciones de estudio.

Población (n)	*CYP2C9 IVS8-109A>T*					Referencias
	AA Frec. (n)	AT Frec. (n)	TT Frec. (n)	T Frec. (n*)	95% IC	
Sueca (85)*	0.494 (42)	0.376 (32)	0.129 (11)	0.318 (54)	0.252-0.391	Hatta y cols., 2012
Coreana (128)*	0.406 (52)	0.445 (57)	0.148 (19)	0.371 (95)	0.314-0.432	Hatta y cols., 2012
Coreana (50)	0.340 (17)	0.480 (24)	0.180 (9)	0.420 (42)	0.328-0.518	Lee y cols., 2010
Japonesa (263)	0.285 (75)	0.517 (136)	0.198 (52)	0.456(240)	0.414-0.499	Maekawa y cols., 2006
Ecuatoriana (187)	0.615(115)	0.342 (64)	0.043 (8)	0.214 (80)	0.175-0.258	Este estudio
Cubana-Caucásica (105)	0.457 (48)	0.448 (47)	0.095 (10)	0.320 (67)	0.260-0.385	Este estudio
Cubana-Mestiza (108)	0.296 (32)	0.444 (48)	0.259 (28)	0.481 (104)	0.416-0.548	Este estudio
Española (92)	0.380 (35)	0.478 (44)	0.141 (13)	0.380 (70)	0.313-0.452	Este estudio

n= número de sujetos**; n*=** número de alelos; *= individuos sin los alelos *CYP2C9*2* ni *CYP2C9*3*, con genotipo *CYP2C9*1/*1;* **IC**= Intervalo de confianza de la frecuencia alélica.

Tabla 15. Relación estadística de las frecuencias alélicas del SNP *CYP2C9 IVS8-109 T* entre las diferentes poblaciones de estudio.

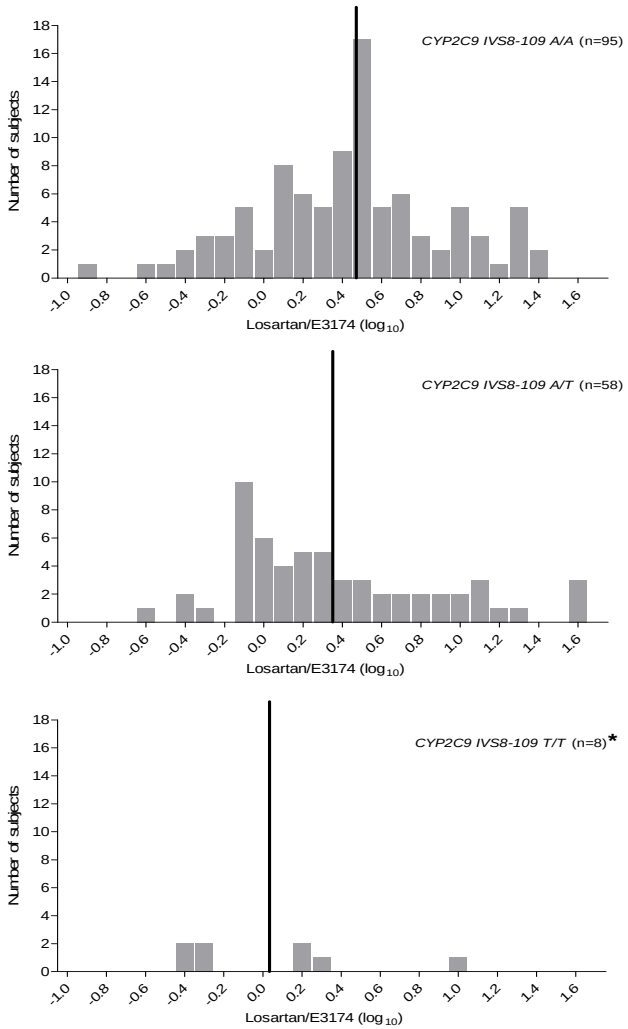
Población (n)	Frecuencia (n*)	Referencias	S (85) 0.318	C (128) 0.371	J (263) 0.456	EC (187) 0.214	CC (105) 0.320	CM (108) 0.481	ES (92) 0.380
S (85)*	0.318 (54)	Hatta y cols., 2012		ns	<0.0001	0.0102	ns	0.0012	ns
C (128)*	0.371 (95)	Hatta y cols., 2012	ns		<0.0001	<0.0001	ns	0.0193	ns
J (263)	0.456 (240)	Maekawa y cols., 2006	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
EC (187)	0.214 (80)	Este estudio	0.0102	<0.0001	<0.0001		0.0055	<0.0001	<0.0001
CC (105)	0.320 (67)	Este estudio	ns	ns	<0.0001	0.0055		0.0008	ns
CM (108)	0.481 (104)	Este estudio	0.0012	0.0193	ns	<0.0001	0.0008		0.0438
ES (92)	0.380 (70)	Este estudio	ns	ns	<0.0001	<0.0001	ns	0.0438	

n= número de sujetos**; n*=** número de alelos; *= individuos sin los alelos *CYP2C9*2* ni *CYP2C9*3*, con genotipo *CYP2C9*1/*1.* [P]Test exacto de Fisher, p< 0.05; diferencias estadísticamente significativas. S= suecos; C= Coreanos; J= japoneses; EC= ecuatorianos; CC= cubanos caucásicos; CM= cubanos mestizos; ES= españoles.

1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos

Cuando se comparó el IM de losartán entre los diferentes genotipos del *CYP2C9 IVS8-109 A>T* (Figura 7), se pudo observar que la media del IM de losartán/E-3174 fue significativamente diferente entre los tres grupos con distinto genotipo *CYP2C9 IVS8-109 A>T* (test Kruskal-Wallis; p=0.0411; n=161).

Figura 7. Histograma con la distribución de las frecuencias de losartán/E-3174 (log $_{10}$) en voluntarios sanos ecuatorianos con diferente genotipo *CYP2C9 IVS8-109 A>T* (n=161). [Las líneas verticales muestran la relación losartán/E-3174 (log10) entre cada grupo; ***p=0.0209** comparado con el grupo con genotipo *CYP2C9 IVS8-109 A*/A por el t-test de Mann-Whitney].



Por otro lado, el IM de losartán /E-3174 fue más alto (test Mann-Whitney; p=0.0209) en sujetos con el genotipo *IVS8-109 A/A* (mean ±SD, 4.8±5.8; n=95) que en sujetos con genotipo *T/T* (mean ± SD, 2.3± 3.7; n=8) (Figura 7).

Además, el IM de losartán/E-3174 en individuos con genotipo *IVS8*-109 *A/T*, no muestra diferencias estadísticamente significativas con el IM de individuos con genotipo *A/A*.

2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE *UGT1A4* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO

2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas

2.1.1. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población española

Las frecuencias de los genotipos *UGT1A4* en esta población de voluntarios sanos españoles se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado, p>0.05) (Tabla 16). El genotipo del gen *UGT1A4* más común en la población española es *wt/*1b* (22.6%).

Tabla 16. Frecuencias de los genotipos observados y esperados de *UGT1A4* en una población de voluntarios sanos de España (n=318).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
wt/wt	149	0.470	0.414-0.523	0.449
*wt/*1b*	72	0.226	0.184-0.276	0.234
*wt/*2*	28	0.088	0.061-0.125	0.093
*wt/*3*	28	0.088	0.061-0.125	0.116
**1b/*1b*	9	0.028	0.014-0.054	0.030
**1b/*2*	6	0.019	0.008-0.041	0.024
**1b/*3*	15	0.047	0.028-0.077	0.030
**2/*2*	2	0.006	0.000-0.024	0.005
**2/*3*	6	0.019	0.008-0.041	0.012
**3/*3*	3	0.009	0.010-0.029	0.007

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=0.9527).

Las frecuencias de los diferentes alelos estudiados fueron del 17.4% (95% IC= 0.146-0.205), 6.9% (95% IC= 0.051-0.091) y 8.6% (95% IC= 0.071-0.116) para los alelos *UGT1A4*1b*, *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*, respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencias alélicas de *UGT1A4* en la población estudiada de voluntarios sanos de España (n= 318).

Alelos *UGT1A4*	n	Frecuencias observadas	95 % IC
wt	426	0.670	0.629-0.702
**1b*	111	0.174	0.146-0.205
**2*	44	0.069	0.051-0.091
**3*	55	0.086	0.071-0.116

n= número de individuos; **IC**= Intervalo de confianza.

2.1.2. Frecuencias de los genotipos UGT1A4 en una población mexicana-mestiza

El genotipo más frecuente en una población de voluntarios sanos mexicanos-mestizos fue *wt/*3*, a diferencia del genotipo *wt/*1*, el más abundante en la población de voluntarios sanos española.

El genotipo *UGT1A4*2/*2* no se ha detectado en la población mexicana-mestiza (Tabla 18) y solo dos individuos presentaron dicho genotipo en la población española de estudio.

Tabla 18. Frecuencias de los genotipos observados y esperados de *UGT1A4* en una población de voluntarios sanos mexicanos-mestizos (n=248).

Genotipo	n	Frecuencias observadas	95 % IC	Frecuencias† esperadas
wt/wt	144	0.581	0.518-0.640	0.575
*wt/*1b*	27	0.109	0.075-0.154	0.116
*wt/*2*	11	0.044	0.024-0.079	0.052
*wt/*3*	50	0.202	0.156-0.256	0.199
**1b/*1b*	3	0.012	0.002-0.037	0.006
**1b/*2*	1	0.004	0.000-0.025	0.005
**1b/*3*	4	0.016	0.005-0.042	0.020
**2/*2*	0	0	0.000-0.018	0.001
**2/*3*	5	0.020	0.007-0.048	0.009
**3/*3*	3	0.012	0.002-0.037	0.017

n= número de sujetos; **IC**= Intervalo de confianza; †Calculada por la ley de Hardy-Weinberg (χ^2test: p=0.9527).

Las frecuencias alélicas de *UGT1A4*1b* y *UGT1A4*2* fueron más altas en individuos españoles que en mexicanos-mestizos (p<0.05) (Tabla 19). Sin embargo, la frecuencia del alelo *UGT1A4*3*, fue mayor en mexicanos-mestizos que en españoles (p<0.05).

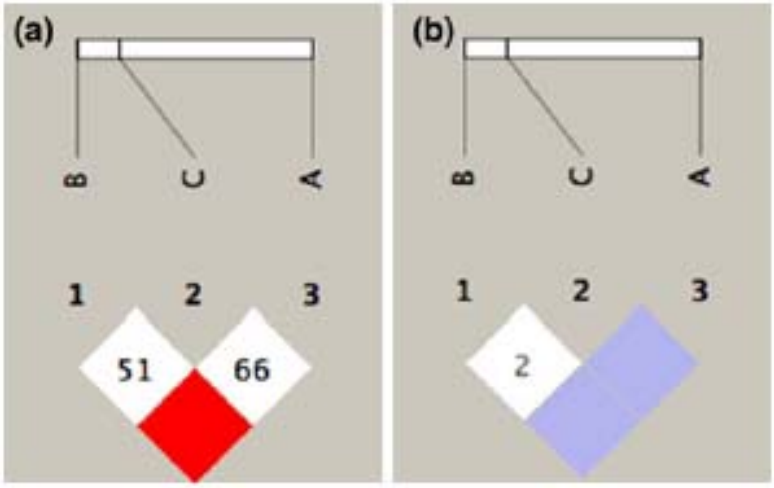
Tabla 19. Comparación de frecuencias alélicas de *UGT1A4* entre voluntarios sanos mexicanos-mestizos y españoles.

Alelos *UGT1A4*	Mestizos-Mexicanos (n=248)			Españoles (n=318)			*p*-valor†
	n	Frec. Obser.	95% IC	*n*	Frec. Obser	95% IC	
wt	376	0.758	0.7184-0.7937	426	0.670	0.6292-0.7021	0.016
**1b*	38	0.076	0.0561-0.1036	111	0.174	0.1462-0.2051	0.0001
**2*	17	0.034	0.0211-0.0546	44	0.069	0.0515-0.0913	0.0113
**3*	65	0.131	0.1040-0.1637	55	0.086	0.0707-0.1157	0.0193

n= número de sujetos; † Test exacto de Fisher**,** α= 0.05. **Frec. Obser.=** frecuencias observadas.

Los haplotipos fueron deducidos de los datos del genotipo (Fig.8). Un total de 6 y 7 haplotipos diferentes se observaron en la población mexicana-mestiza y española, respectivamente. Sin embargo, cuatro haplotipos iguales fueron detectados en más del 5% en ambas poblaciones, pero con diferentes frecuencias.

Figura 8. Estructura del haplotipo de las variantes alélicas del gen *UGT1A4* estudiadas (software Haploview).



(a)= población Española; *(b)* población Mexicana. B= *UGT1A4*2;* C= *UGT1A4*3b*; A=*UGT1A4*1b*. Distancias relativas B-C=72 nt, C-A=392 nt, B-A0401 nt (nt= nucleótidos). D´ toma valores 0-1. Caja roja = D´= 1 y LOD>2; Caja azul= D´= 1 y LOD<2; Caja blanca = D´< 1 y LOD<2. LOD = log odds para el desequilibrio de ligamiento. D´=1 indica que los dos SNPs no están separados por recombinación. LOD>2 indica que hay una fuerte evidencia de LD. Valores menores D´ indica algo de evidencia de recombinación.

En la población española, el haplotipo más común fue el "wild-type" (wt) CTC (68%) y solamente tres haplotipos más, fueron encontrados en un porcentaje mayor del 5%: CTT (16.6%), CGC (7.8%) y ATC (6.5%). La frecuencia de estos haplotipos y los correspondientes SNPs sugieren que la mutación C>T en posición 3, ocurre primero y que las otras dos suceden más tarde e independientemente (Fig. 8a). En la población mexicana-mestiza el haplotipo más común fue también el wt CTC (75.7 %), pero los otros 2 haplotipos, se encontraron con valores mayores al 5%: CGC (12.8 %) y CTT (8.0 %) (Fig. 8b). El haplotipo ATC (3.2 %) fue el cuarto más común pero con una frecuencia menor del5 %. Todos estos haplotipos corresponden a estos tres SNPs, donde se encontraban independientemente en la misma forma "wild-type".

2.1.3. Frecuencias alélicas del gen UGT1A4 en otras poblaciones

Las frecuencias alélicas encontradas en la población de voluntarios españoles fueron comparadas con otras poblaciones previamente reportadas en la literatura (Tabla 20). El alelo *UGT1A4*1b* está presente con alta frecuencia en caucásicos (17.6%-20.9%), disminuye hasta un 7.6% en la población mexicana-mestiza y a un 4% en la población africana, estando ausente en poblaciones asiáticas. En la población española aparece de forma similar a la caucásica (17.4%) y muy alejada de la población asiática, africana y mexicana-mestiza. El alelo *UGT1A4*2* aparece en una frecuencia de 6.9 % en la población española, similar a la encontrada en poblaciones caucásicas (4.9%-8%) y mucho mayor a la encontrada en la población mexicana-mestiza. El alelo *UGT1A4*3* tiene una frecuencia de 8.6% en la población española, similar a poblaciones caucásicas (8.3%-11%) y africana (9%), mayor a la jordana (3.5%) y menor frecuencia que en las poblaciones asiáticas (12-19%) y en la mexicana-mestiza (13.1%).

Tabla 20. Frecuencias alélicas de *UGT1A4* en la población de voluntarios sanos española (*n*=318) comparadas con otras poblaciones.

Población estudiada	*n*	Frec.(%) UGT1A4*1b	SP *p*-valor†	Frec.(%) *UGT1A4*2*	SP *p*-valor†	Frec.(%) *UGT1A4*3*	SP *p*-valor†	Referencia
Caucásica	92	17.6	1.0000	8.8	0.3376	11.0	0.3835	Thomas y cols., 2006
Alemana	83	n.a.	n.a.	8.0	0.4094	9.0	0.8487	Ehmer y cols., 2004
Francesa-Canadiense	254	20.9	0.1498	4.9	0.1707	8.3	0.8318	Ménard y cols., 2009
Asiática	46	0.0	<0.0001	0.0	0.0388	19.6	0.0026	Thomas y cols., 2006
Japonesa	256	1.0	<0.0001	0.0	0.0001	12.9	0.0206	Saeki y cols., 2005
Japonesa	301	0.0	<0.0001	0.0	0.0001	13.0	0.0168	Saeki y cols., 2006
Japonesa	100	0.0	<0.0001	0.0	0.0001	16.5	0.0023	Mori y cols., 2005
Coreana	50	0.0	<0.0001	0.0	0.0023	12.0	0.4740	Yea y cols., 2008
Jordana	216	n.a.	n.a.	6.5	0.8050	3.5	0.0003	Hakooz y cols., 2012
Africana	59	4	<0.0001	0.0	0.0009	9.0	0.8590	1000 Genomes Project.
México-Mestiza	248	7.6	<0.0001	3.4	0.0113	13.1	0.0193	Este estudio
Española	318	17.4		6.9		8.6		Este estudio

n= número de sujetos; **n.a.**= no analizado; **SP**= Española; †Test exacto de Fisher**,** α= 0.05**.**

V. DISCUSIÓN

1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP *IVS8-109A>T* DEL GEN *CYP2C9* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA ..... - 83 -
1.1. Estudio I.1. Desarrollo de un método para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T*.... - 83 -
1.2. Estudio I.2. Determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población española y diferencias interétnicas..... - 83 -
1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos. ..... - 84 -
2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE *UGT1A4* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO ..... - 87 -
2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas..... - 87 -

1. ESTUDIO I. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL SNP *IVS8-109 A>T* DEL GEN *CYP2C9* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA, ECUADOR Y CUBA

1.1. Estudio I.1. Desarrollo de un método para la detección del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T*

En este estudio se desarrolló un nuevo método de análisis genético para la detección del SNP *IVS8 -109 A>T* del gen *CYP2C9* ajustado a las condiciones de nuestro laboratorio. El método fue adaptado a partir del descrito en el estudio de Hatta y cols. (2012), presentando algunas ventajas con respecto a este último. Una de las ventajas principales fue el menor coste invertido en su desarrollo, puesto que la enzima de restricción utilizada es aproximadamente 5 veces más económica que la utilizada en el método original (4 cent. €/U *vs*. 10 cent. €/U). Además, se optimizó el método reduciendo la cantidad de primers y enzima EcoTaq polimerasa por reacción de PCR. Por todo ello, para un estudio de poblaciones donde se analizan gran cantidad de muestras, puede suponer un importante ahorro.

En la validación del método se amplificaron muestras control que fueron replicadas al 100%. Para corroborar la eficacia del método PCR se procedió a digerir el resultado de la amplificación con enzimas de restricción de diferentes sitios de corte, los cuales verificaron la correcta amplificación del fragmento y la determinación del SNP. La enzima de restricción *Hinf I* fue la utilizada para el análisis de todas las muestras incluidas en la presente Tesis.

1.2. Estudio I.2. Determinación del SNP *CYP2C9IVS8-109 A>T* en la población española y diferencias interétnicas

Las frecuencias genotípicas fueron diferentes solo en el caso de la población de voluntarios sanos españoles y cubanos mestizos, que presentaban como genotipo más frecuente *CYP2C9 IVS8-109 A/T* (Tabla 10 y Tabla 13). La frecuencia alélica del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* en la población de voluntarios española (0.38) fue similar a la de la población cubana con origen caucásico (0.32),

mayor que la encontrada en la población de voluntarios sanos ecuatorianos (0.21; $p<0.05$), aunque menor a la encontrada en voluntarios sanos cubanos mestizo (0.48; $p<0.05$).

En la comparación de la frecuencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* presente en la población española, con otras previamente estudiadas en la literatura, las frecuencias alélicas fueron diferentes significativamente ($p<0.0001$). La población española mostró grandes diferencias en la frecuencia de este SNP con la población japonesa (Maekawa y cols., 2006), siendo mayor que en la población sueca (0.32), aunque no significativamente (Hatta y cols., 2012).

La frecuencia del SNP *IVS8-109 A>T* ha sido evaluada en muy pocas poblaciones (Tabla 14). Entre los estudios que han analizado su frecuencia (suecos y otras tres poblaciones de Asia), este alelo parece presentar una menor frecuencia en ecuatorianos y una mayor en japoneses (Maekawa y cols., 2006). Como se observó recientemente, dentro de la población cubana y en relación con las poblaciones hispánicas ecuatorianas y españolas, existe también una marcada diferencia interétnica en el genotipo y fenotipo de la enzima CYP2C9 (Llerena y cols., 2014) siendo la población cubana-mestiza similar a la población japonesa y diferente significativamente de la ecuatoriana. La cubana-caucásica está, sin embargo, muy alejada de la japonesa.

En base a estos resultados, serían necesarios más estudios de este SNP en otras poblaciones de diferente origen étnico y geográfico.

1.3. Estudio I.3. Influencia del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* sobre la hidroxilación de losartán en voluntarios sanos

De acuerdo a los resultados, parece que el alelo *CYP2C9 IVS8-109 T* está asociado con un incremento de la actividad CYP2C9 en individuos con genotipo homocigoto mutante para este SNP (*IVS8-109 T/T*). Estos individuos presentaron un IM urinario, losartán/E-3174, menor que aquellos individuos con genotipo *IVS8-109A/A* (2.3±3.7 *vs*. 4.8±5.8; $p=0.021$).

Este resultado es contradictorio a los obtenidos previamente en voluntarios sanos suecos, donde se observó que el alelo *IVS8-109 T* era más frecuente en un grupo de individuos con el IM de losartán más alto, frente a un grupo con el IM más bajo (Hatta y cols., 2012), relacionando este hecho con una menor actividad de la enzima, cuando se presentaba este SNP. Por otro lado, en el estudio mencionado, no pudieron replicar este resultado en otra población de individuos coreanos, donde no se observaron diferencias significativas en la media de los IM entre los diferentes genotipos del *IVS8-109 A>T*.

Este SNP *IVS8-109 A*>T parece ser que se encuentra en ligamiento con otros SNPs en el exón 5´-UTR, exón 1 e intrón 1 del gen *CYP2C9* (Maekawa y cols., 2006). Además, este SNP está también formando parte de diferentes haplotipos de *CYP2C9* que están presentes en las poblaciones japonesas y coreanas (Maekawa y cols., 2006; Lee y cols., 2010), como se demostró cuando se evaluó la asociación entre los haplotipos *CYP2C9* con la sensibilidad a warfarina, donde el SNP *IVS8-109 A>T* no era uno de los que influían en dicha sensibilidad (Lee y cols., 2010).

Por tanto, el potencial efecto del SNP*IVS8-109 A>T* sobre la actividad de CYP2C9 podía ser debido al ligamiento de este SNP con otros SNP, que podrían diferir entre poblaciones. Por otro lado, los voluntarios ecuatorianos representan a una población con mezcla etnia, en su mayoría amerindia, hispano-europea y africana (Dorado y cols., 2012a; 2012c), con lo que la existencia de algunos alelos desconocidos no puede estar descartada en la población de estudio.

La discrepancia entre la relación de este SNP con una baja actividad de CYP2C9 en suecos y con una alta actividad de CYP2C9 en ecuatorianos, puede ser debida a factores antes mencionados, relacionados a un fondo genético y/o relacionados con diferencias en los resultados fenotípicos. De acuerdo con esto, se ha señalado que los valores medios de IM de losartán fueron significativamente menores entre los homocigotos “wild-type” (*wt/wt*) *CYP2C9* en suecos que en ecuatorianos (0.9 ± 1.7 *vs.* 4.5 ± 4.7, respectivamente. $p<0.05$), sugiriendo que los ecuatorianos tienen una menor capacidad hidroxiladora CYP2C9 (Dorado y cols., 2012a).

Esta diferencia en la media de los valores de IM de losartán no puede ser explicada por las variantes **2* o **3* del *CYP2C9*, pues todos los individuos seleccionados fueron *CYP2C9*1/*1*.

Otras de la diferencias con el anterior estudio, es que existen variaciones en los métodos de fenotipación utilizados para analizar las concentraciones de losartán y su metabolito (E-3174) en orina. El método de fenotipación utilizado, en el presente estudio, consistió en la administración de una dosis única de losartán (Dorado y cols., 2012a), mientras que en el otro estudio, se utilizó el "Cocktail Karolinska", el cual no consistía únicamente en una dosis de losartán, sino que se administró de forma simultánea junto a otros fármacos-test para otros citocromos P-450 (Hatta y cols., 2012). También debe destacarse, que el número de sujetos con genotipo *IVS8-109 T/T* es relativamente bajo en las tres poblaciones, donde la influencia de este SNP sobre el IM de losartán ha sido evaluado (n=8 en ecuatorianos, n=11 en suecos y n= 19 en coreanos).

Actualmente no hay evidencias de la existencia de polimorfismos que den como resultado un fenotipo metabólico ultrarrápido para la enzima CYP2C9. Los estudios acerca del metabolismo ultrarrápido de la enzima CYP2D6 ponen de manifiesto la gran importancia que tiene el conocimiento de la dotación genética, multiplicaciones en el número de copias del gen *CYP2D6,* sobre la eficiencia y seguridad en el tratamiento con fármacos (LLerena y cols., 2011; Peñas-Lledó y cols., 2012; Peñas-Lledó y cols., 2013).

Sería de gran interés hacer más estudios farmacocinéticos en individuos que porten esta mutación. Además, sería necesaria la realización de estudios con diferentes fármacos-test para evaluar la actividad de la enzima CYP2C9 y poder así dirimir la potencial influencia del SNP *IVS8-109 A>T* sobre la actividad hidroxiladora del CYP2C9. También se deberían realizar estudios de fenotipación en otras poblaciones para evaluar las posibles diferencias interétnicas con respecto a este SNP.

La evaluación de la capacidad de hidroxilación de CYP2C9 es importante para el tratamiento farmacológico personalizado. Mientras que la actividad enzimática es comúnmente evaluada a

partir de los alelos *CYP2C9*2* y **3*, los SNPs adicionales, incluyendo al nuevo polimorfismo intrónico *CYP2C9 IVS8-109 A>T*, deberían tenerse en consideración.

En conclusión, los resultados contradictorios en la relación entre el SNP *IVS8-109 A>T* y el IM de losartán entre suecos y ecuatorianos, podría ser debido a diferencias genéticas entre las dos poblaciones, que pueden estar relacionadas con un importante desequilibrio de ligamiento. Otro factor reseñable es la diferencia generalizada en la media de la capacidad de hidroxilación de losartán entre las dos poblaciones, por lo que la asociación de estos SNPs y el IM de losartán necesita ser clarificado, con una explicación molecular para esclarecer el incremento del metabolismo CYP2C9.

2. ESTUDIO II. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE *UGT1A4* EN LAS POBLACIONES DE ESPAÑA Y MÉXICO

2.1. Estudio II.1. Determinación de los genotipos *UGT1A4* en la población española y diferencias interétnicas

La frecuencia de los alelos *UGT1A4*1b*, **2* y **3* entre la población española y la mexicana mestiza fue diferente para los tres alelos. Las variantes alélicas *UGT1A4*1b, *2 y *3* aparecieron con una frecuencia de 17.4%, 6.9% y 8.6%, respectivamente, mientras que las frecuencias obtenidas en la población mexicana-mestiza fueron de 7.6%, 3.4% y 13.1%, respectivamente.

La estimación de las diferencias interétnicas en polimorfismos genéticos relevantes es interesante para la implementación clínica de la farmacogenética, en orden a optimizar los tratamientos con fármacos para una población dada, con respecto al marco étnico. Con otras poblaciones estudiadas también se presentan diferencias interétnicas (Tabla 20). El alelo *UGT1A4*1b* aparece con mayor frecuencia en la población española frente a la mexicana-mestiza, estando en concordancia con los datos del Proyecto Genoma 1000, en la que dicha variante alélica presentaba una frecuencia más alta en europeos (18%) frente a americanos (13%), siendo muy poco frecuente en poblaciones

asiáticas (1%) y africanas (4%). Las frecuencias de los alelos *UGT1A4*2 y *3* en la población española es similar a otras poblaciones caucásicas (Ehmer y cols., 2004; Thomas y cols., 2006; Ménard y cols., 2009). Sin embargo, la frecuencia de *2 fue menor y la de *3 más alta en la población mexicanos-mestizos, frente a varias poblaciones caucásicas. Las frecuencias de *UGT1A4*2* en españoles y mexicanos-mestizos fue más alta que las observadas en poblaciones asiáticas (Saeki y cols., 2005; Mori y cols., 2005; Yea y cols., 2008), mientras que para el alelo *UGT1A4*3* fueron menores en españoles pero similares entre mexicanos-mestizos, comparados con asiáticos.

La frecuencia del alelo *UGT1A4*2* en jordanos fue similar a la de los españoles, aunque más alta que en mexicanos-mestizos, mientras que la del alelo *UGT1A4**3 en jordanos es menor dos y tres veces que en españoles y mexicanos-mestizos respectivamente (Hazook y cols., 2012). En africanos *UGT1A4*2* está ausente (1000 Genomes Project. http://www.1000genomes.org/), pero aparece con mayor frecuencia en españoles y en mexicanos-mestizos. El alelo *UGT1A4*3* estaba con una frecuencia observada similar en mestizos-mexicanos y españoles.

A diferencia de la similitud que guarda la población española con la caucásica en las frecuencias de los alelos *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*, la población mexicana mestiza muestra diferencias con la caucásica (Ehmer y cols., 2004; Thomas y cols., 2009), pues la frecuencia del alelo *UGT1A4*3* es similar entre españoles, mexicanos-mestizos y africanos y entre mexicanos y asiáticos. Así la distribución de *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3* en la población mexicana mestiza puede estar influenciada por mezcla de caracteres, ya que, de acuerdo a los resultados, tanto los alelos *UGT1A4*1b* como *UGT1A4*2* predominan en poblaciones caucásicas y están ausentes en poblaciones asiáticas, mientras que el alelo *UGT1A4*3* muestra una alta relación con poblaciones asiáticas. La estimación de la mezcla genética y diversidad de la población mexicana mestiza ha sido caracterizada revelando un componente amerindio (69%), europeo (26%), procedente principalmente de España (Castilla, Andalucía, Extremadura) y africano (5%) (Juárez-Cedillo y cols., 2008). Las tres variantes

alélicas analizadas en esta región genética indican un desequilibrio de ligamiento (LD) positivo, para *UGT1A4**2 y *UGT1A4*3*, en la población española.

Sin embargo, estas variantes no están LD en la población mexicana mestiza, sugiriendo que estas mutaciones surgen independientemente en el mismo marco genético.

La sustitución P24T y L48V se ha observado en LD alemanes, pero no en la población francesa-canadiense (Ehmer y col., 2004; Benoit-Biancamano y col., 2009). El patrón LD observado en la población francesa-canadiense fue similar al de la población mexicana mestiza.

Por el contrario, el análisis de Haploview indicó LD positivo entre las variantes *UGT1A4**2 y *UGT1A4*3* para la población española, de manera similar a la alemana. Estas variantes alélicas han sido asociadas con una actividad de glucuronización reducida (Ehmer y col., 2004). Las discrepancias en el patrón LD entre españoles y mexicanos-mestizos pueden ser atribuidas a diferencias étnicas y estudios adicionales deberían clarificar si esta asociación no aleatorizada de estos alelos, puede contribuir a diferencias en la glucuronización de UGT1A4.

Los resultados confirman que estas tres variantes alélicas del gen *UGT1A4* estudiadas son altamente polimórficas en las poblaciones mexicana mestiza y española estudiadas. Las variantes funcionales de *UGT1A4* han mostrado diferencias en la capacidad de glucuronización, que puede contribuir significativamente a una variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos (Ghotbi y cols., 2010; Gulcebi y cols., 2011). Teniendo en cuenta que UGT1A4 metaboliza muchos fármacos terapéuticos ampliamente usados en ambas poblaciones, es apropiado sugerir que las diferencias genéticas observadas en las distintas poblaciones, pueden explicar parcialmente las diferencias en la respuesta a fármacos.

UGT1A4 es una de las principales enzimas implicadas en la N-glucuronidación de fármacos clínicamente importantes como son: fenitoína, lamotrigina, olanzapina, tamoxifeno, trifluoperazina, tacrolimus y amitriptilina, entre otros (Kubota y cols., 2007; Laverdière y cols., 2011; López y cols., 2011; Kaivosasaari y cols., 2011). Se ha demostrado que *UGT1A4*, junto con *UGT1A1,* pueden ser

la causa de las diferencias interindividuales en la O-glucuronidación de fenitoína en microsomas hepáticos humanos (Nakajima y cols., 2002).

Recientemente se ha encontrado una relación entre la variabilidad en la respuesta clínica y un decrecimiento en la concentración sérica del antiepiléptico lamotrigina, en pacientes epilépticos en monoterapia o politerapia, que presentaban el alelo *UGT1A4*3* (Gulcebiy cols., 2011). En 2011 se desarrolló una evaluación *in vitro* con tres enzimas recombinantes (UGT1A4 "wild-type", UGT1A4 P24T y UGT1A4 L48V), demostrando que la presencia de estas dos variantes pueden producir variaciones interindividuales en el metabolismo *in vivo* de lamotrigina (Zhou y cols., 2011).

Ambos polimorfismos, *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*, afectan a la actividad metabólica *in vivo* de la enzima UGT1A4, P24T y L48V respectivamente, por lo que el gen que la codifica puede ser un buen candidato para el estudio de la variación en la respuesta clínica y en las causas genéticas de la aparición de eventos adversos inducidos por lamotrigina (Ghotbi y cols., 2010; Gulcebi y cols., 2011).

También se han obtenido, a partir de microsomas hepáticos humanos, resultados que sugieren que la variante alélica *UGT1A4*3* puede contribuir significativamente a una variabilidad interindividual en el metabolismo de olanzapina (Erickson-Ridout y cols., 2011; Haslemo y cols., 2012). En un estudio de asociación, el cambio de los aminoácidos L48V en pacientes con esquizofrenia sugiere que este alelo, está asociado con una disminución de la concentración del antipsicótico olanzapina en plasma (Ghotbi ycols., 2010; Erickson-Ridout y cols., 2011). Sin embargo, en otros estudio *in vitro*, utilizando como sustrato otro antipsicótico como es clozapina, la presencia de la variante *UGT1A4*3*, aumentaba la actividad enzimática desencadenando una mayor concentración de los metabolitos clz-5-N-glucorónido y dmclz-glucuronido en comparación con el "wild-type".

Así, de acuerdo a los resultados, podemos hipotetizar que los fármacos metabolizados por UGT1A4 pueden mostrar diferentes perfiles de eficacia/efectos adversos, en las poblaciones mexicanos-

mestizas y españolas. Por ello, serían necesarios realizar más estudios al respecto, en los diferentes grupos étnicos en América.

VI. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES GENERALES ..... - 93 -
2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS ..... - 93 -

1. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de la presente Tesis muestran la existencia de una variabilidad interétnica en la frecuencia del SNP *IVS8-109 A>T CYP2C9* y de las variantes alélicas y genotípicas del *UGT1A4* entre la población española y otras poblaciones iberoamericanas. Además, se ha podido demostrar la potencial influencia del SNP *IVS8-109 A>T* en el aumento de la actividad hidroxiladora de CYP2C9.

2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

2.1. ESTUDIO I. Variabilidad interétnica del SNP *IVS8-109 A>T* del gen *CYP2C9* en las poblaciones de España, Ecuador y Cuba

I.1. El método analítico de RFLP-PCR para la determinación del SNP *CYP2C9 IVS8-109 A>T* desarrollado, ha demostrado ser preciso, exacto, reproducible y de bajo coste, siendo adecuado para su uso en estudios de genotipación en humanos.

I.2. Las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP *CYP2C9 IVS8-109A>T* presentes en la población española, son similares a las descritas previamente en otras poblaciones, excepto a las poblaciones ecuatoriana y cubana-mestiza, con cuyas frecuencias difieren significativamente.

I.3. La presencia de la mutación *CYP2C9 IVS8-109T* parece aumentar la actividad hidroxiladora de CYP2C9, puesto que la presencia de esta variante disminuye el ratio metabólico de losartán /E-3174 en una población de voluntarios sanos.

2.2. ESTUDIO II. Variabilidad interétnica del polimorfismo genético de *UGT1A4* en las poblaciones de España y México

II.1. La variante alélica *UGT1A4*1b* fue la más frecuente en la población española, seguida de *UGT1A4*3* y *UGT1A4*2*.

II.2. Las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *UGT1A4* para las variantes alélicas *UGT1A4*1b*, *UGT1A4*2* y *UGT1A4*3*, en la población española, difieren significativamente con las encontradas en la población mexicana-mestiza, siendo la variante *UGT1A4*3* la más frecuente en esta última.

VII. BIBLIOGRAFÍA

-Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956;124:484-5.

-Argikar UA, Senekeo-Effenberger K, Larson EE, Tukey RH, Remmel RP. Studies on induction of lamotrigine metabolism in transgenic UGT1 mice. *Xenobiotica* 2009;39:826-35.

-Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Prevalence of CYP2C9 variants in the Mexican population. *Arch Med Res* 2008;39:463.

-Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, DalyAK. Association of polymorphisms in the cytochrome P-450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.

-Ali ZK, kim RJ, Ysla FM. CYP2C9 polymorphisms: considerations in NSAID therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009;12:108-14.

-Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56:653-7.

-Allabi AC, Gala JL, Horsmans Y, Babaoglu MO, Bozkurt A, Heusterspreute M, Yasar U. Functional impact of *CYP2C9*5*, *CYP2C9*6*, *CYP2C9*8* and *CYP2C9*11in vivo* among blackAfricans. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:113-18.

-Allabi AC, Gala JL, Horsmans Y. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoinmetabolism in a BlackBeninese population. *Pharamacogenet Genomics* 2005;15:779-86.

-Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, Nacak M, Roots I. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409-15.

-Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, Eliasson E, Dahl ML, Kayaalp SO, Bozkurt A. CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:337-42.

-Back DJ, Orme LE. Genetic factors influencing the metabolism of tolbutamide. *Pharmac Thr* 1989;44:147-55.

-Beech E, Mathur SV, Harrold PB.Phenytoin toxicity produced by tolbutamide. *BMJ* 1988;297:1613-4.

-Benoit-Biancamano M, Adam J, Bernard O, Curt M, Leblanc M, Carón P, Guillermet C. A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:945-54.

-Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P45 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:192-207.

-Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 1997;32:210-58.

-Bloch A, Ben-Chetrit E, Muszkat M, Cara Y. Major bleeding caused by warfarin in a genetically susceptible patient. *Pharmacotherapy* 2002;22:97-101.

-Bock KW. Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochem Pharmacol* 2010;80:771-7.

-Bock KW, Lilienblum W, Fischer G, Schirmer G, Bock-Henning BS. The role of conjugation reactions in detoxication. *Arch Toxicol* 1987;60:22-9.

-Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Loriot MA. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 2005;106:135-40.

-Bönicke R, Reif W. Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrizide in human and animal organism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol* 1953;220:321-3.

-Bozina N, Granić P, Lalić Z, Tramisak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J* 2003;44:425-8.

-Brandolese R, Scordo MG, Spina E, Gusella M, Padrini R. Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for *CYP2C9*3. Clin Pharmacol Ther* 2001;70:391-4.

-Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R. Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:179-84.

-Brunton L. Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. MacGraw-Hill 12a Ed. San Diego, California. 2012.

-Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3:37-52.

-Burchell B, Coughtrie MW. UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Ther* 1989;43:261-89.

-Burchell B, Lockley DJ, Stains A, Uesawa Y, Coughtrie WH. Substrate specificity of human hepatic UDP- glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol* 2005;400:46-57.

-Burian M, Grösch S, Tegeder I, Geisslinger G. Validation of a new fluorogenic real-time PCR assay for detection of CYP2C9 allelic variants and CYP2C9 allelic distribution in a German population. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:518-21.

-Caraco Y, Muszkat M, Wood AJ. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of CYP2C9 activity *in vivo. Pharmacogenetics* 2001;11:587-96.

-Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, Zhang Y, Kashuba AD, Rowland E, Bertino JS Jr.Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9,2C19, 2D6, 3A, N-acetyltransferase -2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:437-47.

-Chan AT, Zauber AG, Hsu M, Breazna A, Hunter DJ, Rosenstein RB, Eagle CJ, Hawk ET, Bertagnolli MM. CytochromeP450 2C9variants influence responseto celecoxibfor prevention of colorectal adenoma. *Gastroenterology* 2009;136:2127-36.

-Chatzistefanidis D, Georgiou I, Kyristsis AP, Markoula S. Functional impact and prevalence of polymorphisms involved in the hepatic glucuronidation of valproic acid. *Pharmacogenomics* 2012;13:1055-71.

-Chen G, Jiang S, Mao G, Zhang S, Hong X, Tang G, Li Z, Liu X, Zhang Y, Xing H, Wang B, Yu Y, Xu X . CYP2C9 Ile359Leu polymorphism, plasma irbesartanconcentration and acute blood pressure reductions in response to irbesartan treatment in Chinesehypertensive patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28:19-24.

-Cholerton S, DalyAK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P-450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:434-9.

-Christensen M, Andersson K, Dalén P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, Tybring G, Wahlberg A, Yasar U, Bertilsson L. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:517-28.

-Congiu M, Mashford ML, Slavin JL, Desmond PV. UDP-glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug Metab Dispos* 2002;30:129-34.

-Court MH. Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metab Rev* 2010;42:202-17.

-Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P- 450 with NADPH: cytochrome P-450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997;7:203-10.

-Crettol S, Petrovic N, Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des* 2010;16:204-19.

-Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem*2001;276:9626-30.

-Dahl ML, JohanssonI, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:516-20.

-De Andrés F, Sosa-Macías M, Lazalde-Ramos PB, Naranjo ME, Tarazona-Santos E, Llerena A; CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. Evaluation of drug-metabolizing enzyme hydroxylation phenotypes in Hispanic populations: the CEIBA cocktail. *Drug Metabol Drug Interact* 2013;28:135-46.

-De Morais SMF, Schweiki H, Blaisdell J, Goldstein JA. Gene structure and upstream regulatory regions of human *CYP2C9* and *CYP2C18*. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:194-201.

-De Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:387-94.

-Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D, Foley JF, Bradbury JA, Murphy E, Steenbergen C, Zeldin DC, Goldstein JA. Detection of human CYP2C8, CYP2C9 and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos* 2007;682-8.

-Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, Wilkinson GR, Schwarz UI. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African-Americans. *Mol Pharmacol* 2001;60:382-7.

-Dorado P, Beltrán LJ, Machín E, peñas-Lledó EM, Terán E, Llerena A & the CEIBA. Losartan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population: influence of CYP2C9 genetic polymorphism, habits and gender. *Pharmacogenomics* 2012a;13:1711-17.

-Dorado P, Berecz R, Cáceres MC, LLerena A. Analysis of diclofenac and its metabolites by highperformance liquid chromatography: relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003a;789:437-42.

-Dorado P, Berecz R, Cáceres MC, González I, LLerena A. Reproducibility over time of the urinarydiclofenac/4'-OH diclofenac ratio among different CYP2C9 genotypes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003b;28:213-5.

-Dorado P, Berecz R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, LLerena A. CYP2C9 genotypes and diclofenaco metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2003c;59:221-5.

-Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2012c;68:637-44.

-Dorado P, López-Torres E, Peñas-Lledó EM, Martínez-Antón J, LLerena A. Neurological toxicity alter phenytoin infusion in a pediatric patient with epilepsy: influence of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB1 genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 2013;13:359-61.

-Dorado P, Machín E, de Andrés F, Naranjo ME, Peñas-Lledó EM, Llerena A; CEIBA.FP Consortium for the Ibero-American Network of Pharmacogenomics RIBEF. Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes. *Drug Metabol Drug Interact* 2012b;27:217-33.

-Dorado P, Sosa-Macias MG, Peñas-Lledó EM, Alanís-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, Lares-Asseff I, Llerena A. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2011;11:108-12.

-Dorado P, Suarez-Kurtz G, LLerena A. Pharmacogenetics of cytochrome P450 in Hispanic populations. En el Capítulo 5 de Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. Instituto Nacional del Cancer. Landes Bioscience. Río de Janeiro, Brasil. 2007. 222 pág.

-Dorado P. Estudio del citocromo CYP2C9 en la población española: implicación en el metabolismo de fármacos en voluntarios sanos y en pacientes psiquiátricos. Tesis Doctoral 2003. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

-Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 2004;39:970-7.

-Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ. Infuence of the defective metabolism of sparteine on its pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1979b;16:189-94.

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

-Erickson-Ridout KK, Zhu J, Lazarus P. Olanzapine metabolism and the significance of UGT1A448V and UGT2B1067Y variants. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:539-551.

-Evans DA, Manley KA, McKusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 1960;2:485-91.

-Evans DA, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J Med Genet* 1980;17:102-05.

-Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-91.

-Ferguson SS, LeCluyse EL, Negishi M, Goldstein JA. Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstone receptor: discovery of a new distal binding site. *Mol Pharmacol* 2002;62:737-46.

-Fischer TL, Pieper JA, Graff DW, Rodgers JE, Fischer JD, Parnell KJ, Goldstein JA, Green Wood R, Patterson JM. Evaluation of potential losartan-phenytoin drug interactions in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:238-46.

-Fisher AA, Le Couteur DG. Intracerebral hemorrhage following possible interaction between celecoxib and clopidogrel. *Ann Pharmacother* 2001;35:1567-9.

-Flórez J. Farmacología humana. En el Capítulo 4 de del Arco C. Metabolismo de los fármacos. Másson 6ª edicción. Barcelona, España. 2013.73 pág.

-Fortuny J, Kogevinas M, Garcia-Closas M, Real FX, Tardón A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Lloreta J, Rothman N, Villanueva C, Dosemeci M, Malats N, Silverman D. Use of analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, genetic predisposition, and bladder cancer risk in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1696-702.

-Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 1994;4:109-16.

-Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effects on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics* 1995;5:389-92.

-Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P-4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:841-7.

-Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke 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;59:303-12.

-García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, Gamito FJ, Agúndez JA. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:47-9.

-Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002;277:209-17.

-Ghosh C, Hossain M, Puvenna V, Martínez-Gonzalez J, Alexopolous A, Janigro D, Marchi N. Expression and functional relevance of UGT1A4 in a cohort of human drug-resistant epileptic brains. *Epilepsia* 2013;54:1562-70.

-Ghotbi R, Mannheimer B, Aklillu E, Suda A, Bertilsson L, Eliasson E, Ösby U. Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variante are predisponed to reduced olanzapine exposure an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:465-74.

-Gilbar PJ, Brodribb TR. Phenytoin and fluorouracil interaction. *AnnPharmacother* 2001;35:1367-70.

-Girard H, Court MH, Bernad O, Fortier LC, Villeneuve L, Hao Q, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perussed L, Guillemette G. Identification of common polymorphisms in the promoter of the *UGT1A9* gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* 2004;14:501-15.

-Goldstein JA. Clinical relevante of genetic polymnorphisms in the human CYP2C subfamily. *J Clin Pharmacol* 2001;52:349-55.

-Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 1994;4:285-99.

-Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC. Thrirteen UDPglucuronosyltranferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001,11:357-68.

-González FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:346-52.

-Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1992;267:83-90.

-Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. A 2.4- megabase physical map spanning the *CYP2C* gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics* 1995;28:328-32.

-Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos* 1996;24:356-63.

-Green MD, King CD, Mojarrabi B, Mackenzie Pl, Tephly TR. Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 1998;26:507-512.

-Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology* 1993;82:21-37.

-Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 2003;3:136-58.

-Guillemette C, Lévesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* 2010; 42:24-44.

-Gulcebi MI, Ozkaynakci A, Goren MZ, Aker RG, Ozkara C, Onat FY. The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. *Epilepsy* 2011; 95:1-8.

-Hakooz N, Alzubiedi S, Yousef AM, Arafat T, Dajani R, Ababneh N, Ismail S. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) polymorphisms in a Jordanian population. *Mol Biol Rep* 2012;39:7763-68.

-Halling J, Petersen MS, Damkier P, Nielsen F, Grandjean P, Weihe P, Lundgren S, Lundblad MS, Brosen K. Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:491-7.

-Haslemo T, Loryan I, Ueda N, Mannheimer B, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Molden E, Eliasson E.UGT1A4*3 encodes significantly increased glucuronidation of olanzapine in patients on maintenance treatment and in recombinant systems. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92:221-7.

-Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevilla J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20:5-20.

-Hatta FHM, Teh LK, Helldén A, Hellgren KE, Roh HK, Salleh MZ, Aklillu E, Bertilsson L. Search for the molecular basis of ultra-rapid CYP2C9-catalysed metabolism: relationship between SNP IVS8-109 A>T and the losartan metabolism phenotype in Swedes. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68:1033-42.

-Helldén A, Bergman U, Engström Hellgren K, Masquelier M, Nilsson Remahl I, Odar-Cederlöf I, Ramsjö M, Bertilsson L. Fluconazole-induced intoxication with phenytoin in a patient with ultra-high activity of CYP2C9. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:791-5.

-Heydel JM, Holsztynska EJ, Legendre A, Thiebaud N, Artur Y, Le Bon AM. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. *Drug Metab Rev* 2010; 42:74- 9.

-Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999;274:15181-5.

-Hirota T, Eguchi S, IeiriI. Impact of Genetic Polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the Pharmacokinetics of Clinically Used Drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2013;28:28-37.

-Horsmans Y, Van den Berge V, Bourckaert A, Desager JP. Phenytoin hydroxylation in a healthy Caucasian population: bimodal distribution of hydroxyphenytoin urinary excretion . *Pharmacol Toxicol* 1997;81:276-9.

-Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc* 1954;70:266-73.

-Hung CC, Liu CJ, Chen CC, Chang CJ, Liou HH. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. *Ther Drug Monit* 2004;26:534-40.

-Ieiri I, Tainaka H, Morita T, Hadama A, Mamiya K, Hayashibara M, Ninomiya H, Ohmori S, Kitada M, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit* 2000;22:237-44.

-Imai J, Ieiri I, Mamiya K, Miyahara S, Furuumi H, Nanba E, Yamane M, Fukumaki Y, Ninomiya H, Tashiro N, Otsubo K, Higuchi S. Polymorphism of the cytochrome P-450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 2000;10:85-9.

-Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116:496-526.

-Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:89-104.

-Ishii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010a;25:134-4.

-Ishii Y, Takeda S, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by protein-protein association. *Drug Metab Rev* 2010b;42:145-58.

-Iwai M, Maruo Y, Ito M., Yamamoto K., Hiroshi S, Takeuchi Y. Six novel UDP glucuronosyltranferase (UGT1A3) polymorphisms whit varying activity. *J Hum Genet* 2004;49:123-28.

-Izukawa T, Nakajima M, Fujiwara R, Yamanaka H, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Ikushiro S, Sakaki T, Yokoi T. Quantitative analysis of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1759-68.

-Jackson PR, Tucker GT, Lennard MS, Woods HF. Polymorphic drug oxidation: pharmacokinetic basis and comparison of experimental indices. *Br J Clin Pharmacol* 1986;22:541-50.

-Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology—with emphasis on cytochrome P450. *Toxicol Sci* 2011;120:1-13.

-Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, Anderson JL, Kimmel SE, Lee MT, Pirmohamed M, Wadelius M, Klein TE, Altman RB. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:625-9.

-Juárez-Cedillo T, Zúñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Barquera R, Gallardo GJ, Sánchez-Arenas R, García-Peña Mdel C, Granados J, Vargas-Alarcón G. Genetic admixture and Diversity estimations in the Mexican-Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2.e37-e39.

-Kaivosaari S, Finel M, Koskinen M. *N*-glucuronidation of drugs and other xenobiotics by human and animal UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* 2011;41:652-69.

-Kaivosaari S, Toivonen P, Hesse LM, Koskinen M, Court MH, Finel M. Nicotine glucuronidation and the human UGT-glucuronosyltransferase UGT2B10. *Mol Pharmacol* 2007;72:761.

-Kalow W. Pharmacogenetics of Drug Metabolism. New York: Pergamon Press; 1992.

-Kalow W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J* 2006;6:162-5.

-Kalow W, Gunn DR. The relation between dose of succinylcholine and duration of apnea in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1957;120:203-14.

-Kaukonen KM, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Fluconazole but not itraconazole decreases the metabolism of losartan to E-3174. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;53:445-9.

-Kazierad DJ, Martin DE, Blum RA, Tenero DM, Ilson B, Boike SC, Etheredge R, Jorkasky DK. Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:417-25.

-Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol Chem*1997;378:787-91.

-Kerb R, Aynacioglu AS, Brackmöller J, Schlangenhaufer R, Bauer S, Szekeres T, Hamwi A, Fritzer-Szekeres M, Baumgartner C, Ongen HZ, Güzelbey P, Roots I, Brinkmann U. The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J* 2001;1:204-10.

-Kesavan R, Narayan SK, Adithan C. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on phenytoin-induced neurological toxicity in Indian epileptic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:689-96.

-Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics* 2001;11:803-8.

-Kimura M, Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Higuchi S. Genetic polymorphism of cytochrome P-450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit* 1998;20:243-7.

-King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000;1:1433-161.

-Kirchheiner J, Bauer S, Meineke I, Rohde W, Prang V, Meisel C, Roots I, Brockmöller J. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* 2002;12:101-9.

-KirchheinerJ, Brockmolle J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77: 1-16.

-Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* 1999;13:289-95.

-Knights KM, Miners JO. Renal UDP-glucuronosyltransferases and the glucuronidation of xenobiotics and endogenous mediators. *Drug Metab Rev* 2010;42:63-73.

-Kóbori L, Köhalmy K, Porragi P, Sárvary E, Gerlei Z, Fazakas J, Nagy P, Járay J, Monostory K. Drug-induced liver graft toxicity caused by cytochrome P450 poor metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008;63:428-36.

-Kosoglou T, Statkeevich P, Johnson-Levonas AO, Paolini JF, Bergman AJ, Alton KB. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 2005:44;467-94.

-Kubota T, Lewis BC, Elliot DJ, Mackenzie PI, Miners JO. Critical roles of residues 36 and 40 in the phenol and tertiary amine aglycone substrate selectivities of UDP-glucuronosyltransferases 1A3 and 1A4. *Mol Pharmacol* 2007;72:1054-62.

-Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J. Glucuronidation of nonsteroidalanti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1027-35.

-Küpfer A, Branch RA. Stereoselective mephobarbital hydroxylation consegregates with mephenytoin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 1985;38:414-8.

-Kutt H, Wolk M, Scherman R, McDowell F. Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. *Neurology* 1964;14:542-8.

-Laverdière I, Caron P, Harvey M, Lévesque E, Guillemette C. In vitro investigation of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for tacrolimus glucuronidation: predominant contribution of UGT1A4. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1127-30.

-Lazarus P, Blevins-PrimeauAS, Zheng Y, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1155:99-111.

-Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002;12:251-63.

-Lee SJ, Jang YJ, Cha E, Kim HS, Lee SS, Shin JG. A haplotype of CYP2C9 associated with warfarin sensitivity in mechanical heart valve replacement patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:213-21.

-Leemann T, Transon C, Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a mayor monooxygenase catalyzingdiclofenac 4´-hydroxylation in human liver. *Life Sci* 1993;52:29-34.

-LeemannT, Kondo M,Zhao J, Transon C, Bonnabry P, Dayer P. The biotransformation of NSAIDs: a common elimination site and drug interactions. *Schweiz Med Wochenschr* 1992; 122:1897-99.

-LLerena A, Alvarez M, Dorado P, González I, Peñas-Lledó E, Pérez B, Cobaleda J, Calzadilla LR. Interethnic defferences in the relevance of *CYP2C9* genotype and environmental factors for diclofenac metabolism in Hispanics from Cuba and Spain. *Pharmacogenomics J* 2014;14:229-34.

-LLerena A, Cobaleda J, Martinez C, Benitez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. *Eur J Drug Metab. Pharmacokinet* 1996;21:129-38.

-LLerena A, Dorado P, O'Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2004;4:403-6.

-Llerena A, Dorado P, Peñas-Lledó EM. Relevance of CYP2D6 for risperidone pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse reactions. *Pharmacogenomics* 2011;12:311-3.

-LLerena A, Valdivielso MJ, Benítez J, Bertilsson L. Reproducibility over time of mephenytoin and debrisoquine hydroxylation phenotypes. *Pharmacol Toxicol* 1993;73:46-8.

-LLerena A. Metabolización hepática de fármacos: interacciones genético-ambientales en el polimorfismo de debrisoquina. Tesis Doctoral 1988. Universidad de Extremadura.

-Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58:641-9.

-López M, Dorado P, Monroy N, Alonso ME, Jung-Cook H, Machín E, Peñas-Lledó EM, LLerena A. Pharmacogenetics of the antiepileptics drugs phenytoin and lamotrigine. *Drug Metab Drug Interact* 2011;26:5-12.

-Machorro-Lazo MV, Flores-Martínez SE, García-Zapién AG, y cols. Genetic frequency of the variant CYP2C9*2 in Western Mexican Mestizos. HGM2003 Posters Abstracts Cancún 2003, (http://hgm2003.hgu.mrx.acuk).

-Mackenzie PL, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:677-85.

-Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, kawamoto M, Kamatsni N, Suzuki K, Yanagawa T, Saito Y, Sawada J. Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet Genomics* 2006;6:497-14.

-Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. Insights on membrane topology and structure/function of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 2010;42:159-66.

-Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977;2:584-6.

-Maitland ML, Grimsley C, Kuttab-Boulos H, Witonsky D, Kasza KE, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. Comparative genomics analysis of human sequence variation in the UGT1A gene cluster. *Pharmacogenomics J* 2006;6:52-62.

-Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and populationpharmacokinetics. *Epilepsia* 1998;39:1317-23.

-Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G.Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000;84:775-8.

-Maruo Y, Iwai M, Mori A, Hiroshi S, Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-Glucuronosyl transferase and Drug Metabolisms. *Curr Drug Metab* 2005;6:91-99.

-McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L, Lo MW, Waldman S, Bjomsson T, Spielbergs, Golberg MR . Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:348-52.

-McFayden MC, Melvin WT, Murray GI. Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol* 1998;55:825-30.

-Ménard V, Girard H, Harvey M, Pérusse L, Guillemette C. Analysis of inherited genetic variations at the *UGT1* locus in the French-Canadian population. *Hum Mutat* 2009;30:677-87.

-Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P-4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:525-38.

-Miners JO, Smith PA, Sorich MJ, McKinnon RA, Mackenzie PI. Predicting human drug glucuronidation parameters: application of in vitro and in silico modeling approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:1-25.

-Miyagi SJ, Collier AC. Pediatric development of glucuronidation: the ontogeny of hepatic UGT1A4. *Drug Metab Dispos* 2007; 35:1587-92.

-Mohamed ME, Frye RF. Inhibitory effects of commonly used herbal extracts on UGT1A4, 1A6 and 1A9 enzyme activities. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1522-28.

-Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005;33:672-75.

-Mulder GJ. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992;32:25-49.

-Nagar S, Remmel RP. Uridine diphosphogucuronosiltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006;25:1659-72.

-Nakajima M, Sakata N, Ohashi N, Kume T, Yokoi T. Involvement of multiple UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms in glucuronidation of 5-(4´-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1250-56.

-NakashimaM, Umemura K. The clinical pharmacology of losartan in Japanese subjects and patients. *Blood Press. Suppl* 1996;2:62-66.

-Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 1997;7:405-9.

-Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet* 1999;56:247-58.

-Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon Mj, Estabrook RW, González FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B. The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *ADN* 1989;8:1-13.

-Nebert DW. Adesnik M, Coon Mj, Estabrook RW, González FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *ADN* 1987;6:1-11.

-Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro n. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. *Ther Drug Monit* 2000;22:230-2.

-Ohno S, Nakajin S. Determination of mRNA espression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* 2009;37:32-40.

-Owens IS, Basu NK, Banerjee R. UDP-glucuronosyltransferases: gene structures of UGT1 and UGT2 families. *Methods Enzymol* 2005; 400:1-22.

-Page MA, Boutagy JS, Shenfield GM. A screening test for slow metabolisers of tolbutamide. *Br J Clin Pharmacol* 1991;31:649-54.

-Pedersen RS, Damkier P, Brosen K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:458-67.

-Pelkonen O, Sotaniemi EA. Environmental factors of enzyme induction and inhibition. *Pharmacol Ther* 1987;33:115-20.

-Peñas-Lledó EM, Blasco-Fontecilla H, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Baca-García E, LLerena A. CYP2D6 and the severity of suicide attempts. *Pharmacogenomics* 2012;13:179-84.

-Peñas-Lledó EM, Trejo HD, Dorado P, Ortega A, Jung H, Alonso E, Naranjo ME, López-López M, LLerena A. CYP2D6 ultrarapid metabolism and early dropout from fluoxetine or amitriptyline monotherapy treatment in mayor depressive patients. *Mol Psychiatry* 2013;18:8-9.

-Pickar D, Rubinow K. Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:75-83.

-Pilotto A, Seripa D, Franceschi M, Scarcelli C, Colaizzo D, Grandone E, *y cols.* Genetic susceptibilityto nonsteroidal anti-inflammatory drug-relatedgastroduodenalbleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms.*Gastroenterology* 2007;133:465-71.

-Radominska-Pandya A, Bratton S, Little JM. A historical overview of the heterologous expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase isoforms over the past twenty years. *Curr Drug Metab* 2005;6:141-60.

-Radominska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, Milev MJ. The crystal structure of human UDP-glucucoronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families. *Durg Metab Rev* 2010;42:133-44.

-Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Farmacología. Elsevier 7º edicción. España, S.A., 2012. 800 pág.

-Reimers A, Ostby L, Stuen I, Sundby E. Expression of UDP-glucuronosyltransferase 1A4 in human placenta at term. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2011;35:79-82.

-Relling MV, Giacomini KM. Capítulo 4, Farmacogenética en Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. McGraw Hill Professional. 11ª Ed. 2005. 2018 pág.

-Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab. Rev* 1997;29:413-580.

-Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 2002;34:83-448.

-Reviriego J, Bertilsson L, Carrillo JA, LLerena A, Valdivielson MJ, Benítez J. Frequency of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in 373 Spanish subjects compared to other Caucasian populations. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44:593-5.

-Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992:267;3257-61.

-Rodriguez-Antona C and Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006;25:1679-91.

-Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary ADNs for multiple members of the human cytochrome P-450IIC subfamily. *Biochemistry* 1991;30:3247-55. Erratum in: *Biochemistry* 1991;32:1390.

-Rowland A, Elliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG, Miners JO. In vitro characterization of lamotrigine N2-glucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1055-62.

-Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, Ozawa S, Kawamoto M, Kamatani N, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Sawada J. Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:144-51.

-Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Ozawa S, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Kunitoh H, Hamaguchi T, Yoshida T, Kubota K, Ohtsu A, Muto M, Minami H, Saijo N, Kamatani N, Sawada JI. Haplotype structures of the UGT1A gene complex in a Japanese population. *Pharmacogenomics* J 2006;6:63-75.

-Sandberg M, Johansson I, Christensen M, Rane A, Eliasson E. The impact of CYP2C9 genetics and oral contraceptives on cytochrome P450 2C9 phenotype. *Drug Metab Dispos* 2004;32:484-9

-Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGEnet systematic rewview and meta-analysis. *Genet Med* 2005;7:97-104.

-Sandwall P, Lo MW, Jonzon B, Dalen P, Furtek C, Ritter M, Alvan G, McCrea J, Sjoqvist F. Lack of polymorphism of the conversion of losartan to its active metabolite E-3174 in extensive and poormetabolizers of debrisoquine (cytochrome p450 2D6) and mephenytoin (cytochromeP450 2C19). *Eur J Clin Pharmacol* 1999;55:279-83.

-Schwarz UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J Clin Invest* 2003;33Suppl 2:23-30.

-Scordo MG, Aklillu E, Yasar Ü, Dahl M-L, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of Cytochrome P-450 2C9 in a Caucasian and a Black-African population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:447-51.

-Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res* 2004;50:195-200.

-Seeringer A, Kirchheiner J. Pharamcogenetics-guided dose modifications of antidepressants. *Clin Lab Med* 2008;28:619-26.

-Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui, Guengerich FP. 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 Pharmacol Exp Ther* 1994;270:414-23.

-Shimada T. Xenobiotic-Metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21:257-76.

-Sosa-Macias M, Lazalde-Ramos PB, Galaviz-Hernández C, Rangel-Villalobos H, Salazar-Flores J, Martínez-Sevilla VM, Martínez-Fierro ML, Dorado P, Wong ML, Licinio J, LLerena A. Influence of admixture components on CYP2C9*2 allele frequency in eight indigenous populations from Northwest Mexico. *Pharmacogenomics J* 2013;13:567-72

-Spina E, D'Arrigo C, Migliardi G, Santoro V, Muscatello MR, Micò U, D'Amico G, Perucca E. Effect of adjunctive lamotrigine treatment on the plasma concentrations of clozapine, risperidone and olanzapine in patients with schizophrenia or bipolar disorder. *Ther Drug Monit* 2006;28:599-602.

-Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, Manucci PM. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics* 2008;9:1237-50.

-Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* 1995;23:207-15.

-Sten T, Bichlmaier I, Kuuranne T, Leinonen A, Yli-Kauhaluoma J, Finel M. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly. *Drug Metab Dispos* 2009;37:417-23.

-Stewart NA, Buch SC, Conrads TP, Branch RA. A UPLC-MS/MS assay of the "Pittsburgh cocktail": six CYP probe –drug/ metabolites from human plasma and urine using stable isotope dilution. *Analyst* 2011:136:605-12.

-Strassburg CP, Mann MP, Tukey RH. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 1998;273:8719-26.

-Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue:identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol* 1997;52:212-20.

-Streetman DS, Bleakley JF, Kim IS, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, *y cols.* Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2 andxanthine oxidasewith the "Cooperstown cocktail". *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:375-83.

-Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P-450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996;6:429-39.

-Suarez-Kurtz G, Genzo JP, de Moraes MO, Ojopi EB, Pena SD, Perini JA, Ribeiro-dos-Santos A, Romano-Silva MA, Santana I, Struchiner CJ. Global pharmacogenomics: Impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. *Pharmacogenomics J* 2012;12:267-76.

-Suarez-Kurtz, Sergio DJ. Pena Pharmacogenetic studies in the Brazilian population en Capítulo 6 de en el Capítulo 5 de Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. Instituto Nacional del Cáncer. Landes Bioscience. Río de Janeiro, Brasil. 2007. 222 pág.

-Sullivan-Klose TH, Ghanayem BL, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;6:341–49.

-Sun D, Sharma AK, Dellinger RW, Blevins-Primeau AS, Balliet RM, Chen G, Boyiri T, Amin S, Lazarus P. Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 2007;35:2006-14.

-Swen JJ, Nijenhnis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RH, Schalekamp T, Touw DJ, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VH, Guchelaar HJ. Pharmacogenetics: from bench to byte—an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:662-73.

-Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarín:

catalytic activities of cADN-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998;8:365-73.

-Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. *CYP2C9* Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics* 2000;10:95-104.

-Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SH, Baillie TA. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol* 1999;12:192-9.

-Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000;96:1816-9.

-Thomas SS, Li SS, Lampe JW, Potter JD, Bigler. Genetic variability, haplotypes and htSNPs for exons 1 at the human UGT1A locus. *Hum Mut* 2006;27:717.

-Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* 2001;59:405-14.

-Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, Boulenc X. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:928-35.

-Van der Weide J, Steijins LS, van Weelden MJ, de Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* 2001;11:287-91.

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

-Varshney E, Saha N, Tandon M, Shrivastava V Ali S. Genotype-phenotype correlation of cytochrome P450 2C9 polymorphism in Indian National Capital Region. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2013;38:275-82.

-Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D, Birkett DJ. Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers. *Clin Pharmacol Ther* 1990;47:403-11.

-Veronese ME, Miners JO, Rees DL, Birkett DJ. Tolbutamide hydroxylation in humans: lack of bimodality in 106 healthy subjects. *Pharmacogenetics* 1993;3:86-93.

-Verstuyft C, Morin S, Robert A, Loriot MA, Beaune P, Jaillon P, Becquemont L. Early acenocoumarol over anticoagulation among cytochrome P450 2C9 poor metabolizers. *Pharamacogenetics* 2001;11:735-7.

-Vesell ES. Pharmacogenetics perspectives: Genes, drug and disease. *Hepatology* 1984;4:959-65.

-Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:18-26.

-Vijverberg SJ, Koenderman L, van Erp FC, van der Ent CK, Postma DS, Brinkman P, Sterk PJ, Raaijmakers JA, Maitland-van der Zee AH. Inflammatory phenotypes underlying uncontrolled childhood asthma despite inhaled corticosteroid treatment: rationale and design of the PACMAN2 study. *BMCPediatr* 2013;13:94.

-Visser LE, van Vliet M, van Schaik RH, Kasbergen AA, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, van Duijn CM, Stricker BH. The risk of overanticoagulation in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Pharmacogenetics* 2004;14:27-33.

-Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *ErgebInn Med Keinderheilk* 1959;12:52-125.

-Wacke R, Kirchner A, Prall F, Nizze H, Schmidt W, Fischer U, Nitschke FP, Adam U, Fritz P, Belloc C, Drewelow B. Up-regulation of cytochrome P-450 1A2, 2C9, and 2E1 in chronic pancreatitis. *Pancreas* 1998;16:521-28

-Wang B, SanchezRI, Franklin RB, EvansDC, Huskey SE. The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 alpha-ethinylestradiol. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1209-12.

-Wang JF, Chou KC. Molecular Modeling of Cytochrome P450 and Drug Metabolism. *Curr Drug Metab* 2010;11:342-46.

-Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics* 1995;5:37-42.

-Wang Z, Wong T, Hashizume T, Dickmann LZ, Scian M, Koszewski NJ, Goff JP, Horst RL, Chaudhry AS, Schuetz EG, Thummel KE.Human UGT1A4 and UGT1A3 conjugate 25-hydroxyvitamin D3: metabolite structure, kinetics, inducibility, and interindividual variability. *Endocrinology* 2014;155:2052-63.

-Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, Hansen AJ, Kessler FK, Kim PM, Chowdhury NR, Ritter JK. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos* 2004;32:281-90.

-Wesseling H, Mols-Thürkow I. Interaction of diphenylhydantoin (DPH) and tolbutamide in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;8:75-8.

-Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P. Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. *Cancer Res* 2004;64:1190-6.

-Wilkinson GR, Guengerich FP, Branch RA. Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation. *Pharmacol Ther* 1989;43:53-76.

-Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 2004; 32:1201-8.

-Williamson KM, Patterson JH, McQueen RH, Adams KF, Pieper JA. Effects of erythromycinor rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:316-23.

-Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:1-21.

-Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1257-70.

-Yamanaka H, Nakajima M, Hara Y, Katoh M, Tachibana O, Yamashita J, Yokoi T. Urinary excretion of phenytoin metabolites, 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin and its O-glucuronide in humans and analysis of genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:135-43

-Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997;346:161-9.

-Yang JQ, Morin S, Verstuyft C, Fan LA, Zhang Y, Xu CD, Barbu V, Funck-Brentano C, Jaillon P, Becquemont L. Frequency of cytochrome P450 2C9 allelic variants in the Chinese and French populations. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:373-6. Erratum in: *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:397.

-Yasar U, Aklillu E, Canaparo R, Sandberg M, Sayi J, Roh HK, Wennerholm A. Analysis of CYP2C9*5 in Caucasian, Oriental and black-African populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2002b;58:555-8.

-Yasar Ü, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. Biochem Biophys Res Commun 1999;254:628-31. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun*1999;227:58.

-Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, LLerena A, Sjöqvist F, Eliasson E, Dahl ML. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2002a;71:89-98.

-Yasar U, Tybring G, Hildestrand M, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Dahl ML, Eliasson E. Role the CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1051-6.

-Yea SS, Lee SS, Kim WY, Liu KH, Kim, *et al.* Genetic variations and haplotypes of UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in a Korean population. *Ther Drug Monit* 2008;30:23-34.

-Yilmaz N, ErbagciAB, AynaciogluAS. Cytochrome P-4502C9 genotype in Southeast Anatolia and possible relation with some serum tumour markers and cytokines. *Acta Biochim Pol* 2001;48:775-82.

-Yin T, Maekawa K, Kamide K, Saito Y, Hanada H, MiyashitaK,Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Horio T, Takiuchi S, Kawano Y, Minematsu K, Naritomi H, Tomoike H, Sawada J, Miyata T. Geneticvariationsof *CYP2C9* in 724 Japanese individuals and their impact on the antihypertensive effectsof losartan. *Hypertens Res* 2008;31:1549-57.

-Yoon YR, Shon JH, Kim MK, Lim YC, Lee HR, Park JY, Cha IJ, Shin JG. Frequency of cytochrome P-450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:277-80.

-Yu BN, Luo CH, Wang D, Wang A, Li Z, Zhang W, Mo W, Zhou HH. CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. *Clin Chim Acta* 2004;348:57-61.

-Yun CH, Lee HS, Lee H, Rho JK, Jeong HG, Guengerich FP. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (Dup 753) in human liver microsomes. Role of cytochrome P4503A(4) in formation of the active metabolite EXP3174. *Drug Metab Dispos* 1995;23:285-9.

-Zhou J, Argikar UA, Remmel RP. Functional analysis of UGT1A4 (P24T) and UGT1A4 (L48V) variant enzymes. *Pharmacogenomics* 2011;12:1671-79.

-Zhou SF, Zhou ZW, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology* 2010;278:165-88.

Sitios Web:

-1000 Genomes Project. http://www.1000genomes.org/.

-GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp-ref.cgi?rs=1934969.

-Haploview v 4.0 software. http.//www.broadinstitute.org/scientificcommunity/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview.

-The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Acceso el 26 agosto, 2014. Disponible en: http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm.

-UGT Alleles Nomenclature Home Page. UGT Nomenclature Committee. June 2005. Acceso el 26 agosto, 2014. Disponible en: http://www.ugtalleles.ulaval.ca.

-UGT1A4 Allele Nomenclature:

http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A4.htm.

VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

1. AGRADECIMIENTOS ..... - 129 -
2. FINANCIACIÓN ..... - 130 -

1. AGRADECIMIENTOS

Quería dar mi más sincera gratitud a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis, sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto.

En principio quiero reseñar a mis tutores, los doctores Adrián LLerena y Pedro Dorado.

Al Dr. Adrián LLerena por su tiempo, dedicación, esfuerzo y paciencia conmigo, por haberme ayudado a superar barreras y mostrarme este mundo tan fascinante que es el de la investigación. Gracias por dejarme formar parte de este equipo.

Al Dr. Pedro Dorado por sus conocimientos transmitidos, consejos y palabras de ánimo claves en la realización de esta tesis y también como no por su paciencia y comprensión.

A la Dra. Eva Peñas por su dedicación, por su tiempo empleado en la escritura de los artículos publicados, así como por su apoyo y palabras de ánimo.

A todos los voluntarios e investigadores clínicos, por su colaboración inestimable, sin cuya participación desinteresada hubiera sido imposible larealización de los estudios de esta Tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros del CICAB, no sólo por su apoyo y contribución en el trabajo, si no por sus palabras de ánimo y su amistad, tan necesario para lograr llevar a buen fin este proyecto.

A mi familia y a mi pareja por su paciencia, apoyo y cariño a lo largo de esta etapa de mi vida. También a personas que se marcharon pero que siempre confiaron en mí.

2. FINANCIACIÓN

Los estudios que conforman la presente Tesis han sido parcialmente soportados por el Instituto de Salud Carlos III-FIS y el Fondo Social Europeo de la Unión Europea (**FEDER**) (**PI10/02010**, **PI10/02758**), PRIS Extremadura, Consejería de Sanidad y Dependencia,el Plan de Investigación Sanitaria en Extremadura (**FundeSalud**) (**PRIS10043**, **PRIS11051**), Cooperación Extremeña del Gobierno de Extremadura (**AEXCID**) (**11IA002**); Fondo Social del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (**CONACYT#167261**) y en coordinación por la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (**SIFF-RIBEF**; www.ribef.com).

AEXCID cooperación extremeña

UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
Una manera de hacer Europa

Servicio Extremeño de Salud

La presente Tesis ha sido realizada en colaboración con el Centro de Investigación Clínica del Área de Salud de Badajoz CiCAB. Hospital Universitario Infanta Cristina

IX. ANEXOS

1. ÍNDICE DE TABLAS ..... - 132 -
2. ÍNDICE DE FIGURAS ..... - 134 -
3. INDICE DE ABREVIATURAS ..... - 135 -

1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de la actividad metabolizadora real de CYP2C9 en distintas poblaciones de voluntarios sanos realizadoscon diferentes fármacos test.

Tabla 2. Variantes alélicas más frecuentes del gen *CYP2C9*.

Tabla 3. Frecuencias del alelo*IVS8-109T* en diferentes poblaciones.

Tabla 4. Frecuencias (%) de las variantes alélicas de *UGT1A4* en distintas poblaciones de estudio.

Tabla 5. Muestras incluidas en los diferentes trabajos que componen la presente Tesis doctoral.

Tabla 6. Secuencias de los primers utilizados para genotipar el *CYP2C9 IVS8-109 A>T*.

Tabla 7.Sondas TaqMan empleadas para la determinación de las variantes alélicasde estudio.

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR para la determinación de la variante alélica *UGT1A4*3*.

Tabla 9. Relación entre genotipo y tamaño de banda resultante de la digestión con la enzima *StuI.*

Tabla 10. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109A/T*en una poblaciónde voluntarios sanos de España (n=92).

Tabla 11. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109A/T*en una poblaciónde voluntarios sanos de Ecuador (n=187).

Tabla 12. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109A/T*en una poblaciónde voluntarios sanos cubana-caucásica (n=105).

Tabla 13. Frecuencias de los genotipos observados y esperados para el SNP *CYP2C9 IVS8-109A/T*en una poblaciónde voluntarios sanos cubana-mestiza (n=108).

Tabla 14. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP*CYP2C9 IVS8-109A>T* en la población de voluntarios sanos españoles (n=92) con otras poblaciones de estudio.

Tabla 15. Relación estadística de las frecuencias alélicas del SNP*CYP2C9IVS8-109T*entre las diferentes poblaciones de estudio.

Tabla 16. Frecuencias de los genotipos observados y esperados de *UGT1A4*en una poblaciónde voluntarios sanos de España (n=318).

Tabla 17. Frecuencias alélicas de *UGT1A4*en la población estudiada de voluntarios sanos de España (n= 318).

Tabla 18. Frecuencias de los genotipos observados y esperados de*UGT1A4*en una población de voluntarios sanos mexicanos-mestizos (n=248).

Tabla 19. Comparación de frecuencias alélicas de *UGT1A4*entre voluntarios sanos mexicanos-mestizos y españoles.

Tabla 20. Frecuencias alélicas de *UGT1A4* en la población de voluntarios sanos española (*n*=318) comparado con otras poblaciones.

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la localizaciónde los polimorfismos detectados en el locus humano *UGT1A* en el cromosoma 2.

Figura 2. Representación del locus CYP2Cdentro del cromosoma 10.

Figura 3. Esquema del análisis de amplificación del SNP *IVS8-109 A>T* del gen *CYP2C9* a partir de los oligonucleótidos específicos, mediante PCR-RFLP.

Figura 4. Electroforesis conel fragmento de 622 pb obtenidapor PCR.

Figura 5. Electroforesis con los fragmentos de las digestiones por *Nsi I*, *Msp I*y *Pst I*.

Figura 6. Electoforesis con los fragmentos de la digestión por *Hinf I.*

Figura 7. Histograma con la distribución de las frecuencias delosartán /E3174 (log_{10}) en voluntarios sanos ecuatorianos con diferente genotipo *CYP2C9 IVS8-109 A>T* (n=161).

Figura 8. Estructura del haplotipo de las variantes alélicas del gen *UGT1A4*estudiadas (Software Haploview).

3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AG: Adenina-Guanina

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

ANOVA: análisis de varianza

Arg: Arginina

Asn: Asparragina

AUC: Área bajo la curva

C: Citosina

CAR: Receptor constitutivo de androstano

Cmax: Concentración máxima

Cols: Colaboradores

CTB: Carboxitolbutamida

CYP: Citocromo P-450

Cys: Cisteína

dbSNP ID: base de datos de polimorfismos de un solo nucleótidoy múltiples variaciones a pequeña escala que incluyen inserciones/delecciones, microsatélites y variantes no-polimórficas identificadas (date base of single nucleotide polymorphisms (SNP) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites and non-polymorphic variants, identification)

Del A: Delección de Adenina

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

EM: metabolizadotes rápido

AGlc: ácido glucurónico

Glu: Glutamina

HPLC: Cromatografía liquida de alta resolución (high-perfomance liquid chromatography)

HTB: Hidroxitolbutamida

IC: intervalo de confianza

Ile: Isoleucina

IM: Índice metabólico

LD: desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium)

Leu: Leucina

L48V: cambio en la posición 48 de la proteína del aminoácido leucina por el aminoácido valina

LTG: Lamotrigina

NADPH: dinucleótido de nicotinamina y adenina fosfato reducido

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

Nt: nucleótido

P24T: cambio en la posición 24 de la proteína del aminoácido prolina por el aminoácido treonina.

Pro: Prolina

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (en ingés, polymerase chain reaction)

pHPPH: 5-(4-p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína

PM: metabolizador lento

PXR: Receptor X de pregnano

R: Cualquier aminoácido

RFLP: polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (restriction fragment lenght)

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms)

SRSS: Sitios de reconocimiento del sustrato

T: Timina

Thr: Treonina

UDP: Uridín-5'-difosfato

UDP-Glc UA: Uridina-5'-difosfato-α-D-ácido glucurónico

UGTs: UDP- glucuronosiltransferasa

UM: metabolizadores ultrarrápidos

UV: ultravioleta

V: Valina

VNCs: Variación en el mismo número de copias

wild-type: Tipo silvestre (wt), alude a la ausencia del alelo/s de estudio

X. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

1: López M, Dorado P, Ortega A, Peñas-Lledó E, Monroy N, Silva-Zolezzi I,Cobaleda J, **Gallego-Aguilera A**, Alonso ME, Llerena A.

Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations.

MolBiol Rep. 2013 Apr;40(4):3187-3192.

2:Dorado P, **Gallego-Aguilera A**, Peñas-Lledó E, Teran E, Llerena A.

Relationship between CYP2C9 IVS8 -109A>T polymorphism and high losartan hydroxylation capacity in Ecuadorians healthy volunteers.

Pharmacogenomics. 2014 Aug;15 (11):1417-1421.

Comunicaciones a Congresos

1.Gallego A, Ortega A, Glez-Naranjo ME, Grillo B, Dorado P, López M, Llerena A.

Determination of allele UGT1A4*3b among epileptic patients treated with lamotrigine.

Jornadas Internacionales de Investigación Clínica.

Badajoz (España), 24 de Noviembre-1 de Diciembre de 2011.

2.Dorado P, Gallego A, Beltrán LJ, Peñas-Lledó EM, Terán E, Llerena A.

Influence of CYP2C9 IVS8-109A>T polimorphism on losartan oxidation in healthy ecuadorians.

Jornadas Internacionales de Investigación Clínica. EACPT.

Ginebre (Suiza), 28-31 de Agosto de 2013.

Mol Biol Rep
DOI 10.1007/s11033-012-2393-2

Interethnic differences in *UGT1A4* genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations

Marisol López · Pedro Dorado · Alberto Ortega · Eva Peñas-Lledó · Nancy Monroy · Irma Silva-Zolezzi · Jesús Cobaleda · Alicia Gallego-Aguilera · María Elisa Alonso · Adrián LLerena

Received: 24 September 2012 / Accepted: 17 December 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) is a phase II drug-metabolizing enzyme that catalyzes the glucuronidation of many clinically-important drugs. Interethnic differences in the genetic polymorphism of *UGT1A4* have been reported; however, there is no information in Mexican Mestizos (MMs) and Spaniards (SPs). Furthermore, MM is an admixed population with 26 % of Caucasian genes mainly from Spain. Therefore, this study aimed to investigate the potential differences between 318 SPs and 248 MMs healthy individuals regarding *UGT1A4*1b*, *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* alleles and to compare the observed frequencies with those previously reported in different populations. The allelic frequencies of the three *UGT1A4* polymorphisms showed interethnic differences between MMs and SPs ($p < 0.05$). The analyzed SNPs variants in this genetic region were not in linkage disequilibrium (LD) for the MM population, suggesting that these mutations have arisen independently in the same genetic background. In contrast, *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* were in LD in the SP population. Comparison of present data with other in different ethnic groups revealed that the frequencies of *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* in SP were similar to other Caucasians and higher than in Asians, whereas in MMs were lower than in Caucasians and higher than in Asians only for *UGT1A4*2*. Present results could be helpful to improve the use of UGT1A4 drug substrates in order to adjust them to the ethnic background of a given population, specifically for Hispanics.

Keywords UGT1A4 · Glucuronidation · Interethnic differences · Mexican-Mestizo · Spaniards

Marisol López and Pedro Dorado contributed equally to this work.

M. López · A. Ortega
Department of Biological Systems, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

P. Dorado · E. Peñas-Lledó · J. Cobaleda · A. Gallego-Aguilera · A. LLerena (✉)
CICAB Centro de Investigación Clínica CIBERSAM, SES Servicio Extremeño de Salud, Hospital Universitario Infanta Cristina, 06080 Badajoz, Spain
e-mail: allerena@unex.es

N. Monroy · M. E. Alonso
Department of Neurogenetics and Molecular Biology, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

I. Silva-Zolezzi
Department of BioAnalytical Sciences, Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Switzerland

J. Cobaleda
Centro de Salud Ciudad Jardín, SES Servicio Extremeño de Salud, Badajoz, Spain

Introduction

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are considered among the most relevant phase II enzymes of drug metabolism. The reaction catalyzed by UGTs involves the addition of a glucuronic acid moiety to xenobiotics. Thus, UGT-mediated glucuronidation is a major path for the human body's elimination not only of about 35 % of all drugs metabolized by phase II enzymes, but also of foreign chemical removal for most drugs, dietary substances, toxins and endogenous substances [1–3].

The human UGT is a large gene superfamily, including the *UGT1A* locus on chromosome 2q37.1, which encodes at least nine functional proteins such as UGT1A4 [4].

Published online: 01 January 2013

UGT1A4 is known to be the primary enzyme that catalyzes *N*-glucuronidation mostly of primary, secondary and aromatic amines, including clinically-important drugs such as phenytoin, lamotrigine, olanzapine, tamoxifen, trifluoperazine, tacrolimus and amitriptyline [5–7]. In addition, UGT1A4 shows *O*-glucuronidation activity towards steroidal compounds and phytochemicals [8]. Nakajima et al. [9] have demonstrated that *UGT1A1* and *UGT1A4* polymorphisms might be a cause of the interindividual differences in *O*-glucuronidation of phenytoin in human liver microsomes. Ehmer et al. [10] identified the UGT1A4 P24T (c.70C>A) and L48V (c.142T>G) variants that exhibited reduced glucuronidation activities with substrate specificity. These natural variations of the *UGT1A4* gene show a differential hepatic metabolic activity toward mutagenic amines and endogenous steroids [10]. Recently, the variability of the clinical outcome in epileptic patients on monotherapy or polytherapy was found to be related to a decreased in the serum concentration of the antiepileptic drug, lamotrigine, due to the L48V polymorphism of *UGT1A4* [11]. In addition, data obtained in human liver microsomes suggest that the L48V polymorphism also contributes significantly to interindividual variability in olanzapine metabolism [12]. Zhou et al. [13] developed an in vitro evaluation with three recombinant UGT1A4 enzymes (UGT1A4 wild-type, UGT1A4 P24T and UGT1A4 L48V) demonstrating that the presence of these two last variants may lead to interindividual variations in lamotrigine metabolism in vivo.

The functional implications for the genetic polymorphisms in *UGT1A4* giving rise to the P24T and L48 V substitutions have been documented in several investigations [9–16]. In an association study, the L48 V change was studied in patients with schizophrenia suggesting that this SNP is associated with lower average plasma concentrations of olanzapine [12, 16]. Both, P24T and L48 V polymorphisms affect the UGT1A4 in vivo metabolism activity and may be good candidates for antiepileptic clinical response variation and as genetic causes of lamotrigine-induced adverse events [11, 16].

The synonymous *UGT1A4*1b* (C157C; c.471C>T) variant has been reported with a high frequency in Caucasians (20.9 % in French-Canadians and 15 % in Germans) [1, 10]. The C157C, P24T and L48V variants correspond to *UGT1A4*1b, *2* and *3* alleles, respectively [17].

The frequency of the genetic polymorphisms in *UGT1A4* has been reported for several populations revealing important differences among them [1, 10, 12, 17–23]; however there is no information regarding these polymorphisms in Mexican Mestizos (MM) and Spaniards (SP). Therefore, the main goal of this study was to determine the genotype and allele frequencies of *UGT1A4*1b, UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* in a sample of MM and SP healthy volunteers.

Subjects and methods

Subjects

Participants were unrelated healthy volunteers of Mexican Mestizo ethnicity from Mexico City and surrounding areas (MMs; $n = 248$; 62 % female; age: 35 ± 16 years, range: 19–65 years) and of Caucasian Spaniard origin from Extremadura (SPs; $n = 318$; 51 % female; age: 43 ± 17 years, range: 18–70 years). The subjects were informed about the aims of the study and gave their written informed consent prior their participation. The study was performed according to the Helsinki Declaration and it was approved by the National Institute of Neurology and Neurosurgery (INNN) Internal Review Board (Mexico City, Mexico) and the Ethical Committee of the Extremadura University Hospital (Badajoz, Spain).

UGT1A4 genotyping

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by standard procedures. PCR–RFLP or real time PCR (RT–PCR) were employed to genotype the different allelic variants **1b, *2* and *3* of the gene *UGT1A4* (MIM 606429). Nomenclature of the three gene variations analyzed was according to the official page of UGT nomenclature [24] The SNPs 70C>A; P24T (rs6755571) and 471C>T; C157C (rs2011404) were genotyped with commercially available TaqMan validated SNP assays (C_25957120_10 and C_8739217_10) from Applied Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, Massachusetts, USA). Amplification was done in accordance with manufacturer's instructions in an AB7300 real time PCR instrument. An allelic discrimination plot was used to identify individual genotypes (v2.0 software, Applied Biosystems). In order to scan the allelic variant 142T>G; L48V (rs2011425) (*1A4*3*), PCR–RFLP with the enzyme *Stu* I was performed with published primers [10, 16].

Subsequently, each allelic variant was confirmed by direct sequencing in five percent of the samples. Oligonucleotide primers and sequencing conditions were those published by Saeki et al. [15]. Purified amplicons were sequenced with Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and separated in a genetic analyzer AB3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, Massachusetts, USA). All sequences were analyzed with Sequencing Analysis v5.3 and every allelic variant was confirmed by sequencing the product of an independent PCR on both strands and verified in different public databases. Nomenclature and positions of the diverse identified polymorphisms are relative to the adenine (+1) of the ATG of the reference sequence of NM_007120.2 → NP_009051.1.

Statistical analysis

The genotype and allele frequencies were assessed for Hardy–Weinberg equilibrium, differences in allele frequencies between the two studied populations and others were calculated by a Chi square test or Fisher's exact test. A p value <0.05 was considered statistically significant. Statystical analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego; CA, USA). Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis were performed using the Haploview software version 4.0 [25]. Haplotypes were inferred from individual genotypes using the software PHASE v2.1 [26]. Conditions employed for the haplotype inference procedure using 3 biallelic SNPs consisted in 100 iterations and 5 thinning interval steps through the Markov chain.

Results

The *UGT1A4* genotype frequencies corresponded to those predicted by the Hardy–Weinberg law. The most common genotypes in SPs and MMs were *wt/*1b* and *wt/*3*, respectively. Interestingly the genotype *UGT1A4*2/*2* was not identified in MMs and only in two SPs, being the least frequent genotype (Table 1). The allelic frequencies of *UGT1A4*2* and *UGT1A4*1b* (Table 2) were higher ($p < 0.05$) in SP individuals (6.9 % and 17.4 %) than in MMs (3.4 % and 7.6 %), respectively. In contrast, the allelic frequency of *UGT1A4*3* was higher ($p < 0.05$) in MMs than SPs. In Table 3, the allele frequencies found in this study are compared with those previously reported in other populations.

Haplotypes were inferred from the genotype data (Fig. 1). A total of seven and six different haplotypes were observed in MM and SP populations, respectively. However, the same four haplotypes above 5 % were observed in both populations but with different frequencies. In SPs, the most common haplotype was the wild-type (wt) CTC (68.0 %), and only three more haplotypes were found above 5 %: CTT (16.6 %), CGC (7.8 %) and ATC (6.5 %). The frequency of these haplotypes and the corresponding SNPs suggests that the C>T mutation in position 3 occurred first and the other two happened later and independently (Fig. 1a). In MMs, the most common haplotype was also the wt CTC (75.7 %), but only two other haplotypes were found above 5 %: CGC (12.8 %) and CTT (8.0 %) (Fig. 1b). The haplotype ATC (3.2 %) was the fourth most common but with a frequency <5 %. All these haplotypes correspond to those where the three SNPs are found independently in the same wild-type background.

Discussion

To our knowledge, this is the first study that examined the allele frequencies of *UGT1A4*1b, *2* and *3* in MM and SP individuals, showing significant differences in these three alleles between the two populations. Estimation of interethnic differences in relevant genetic polymorphisms is interesting for the clinical implementation of pharmacogenetics in order to optimize the drug treatments for a given population with regard to the ethnic background. This is one of the main goals to achieve by the Ibero-Latino-American network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics (RIBEF).

Table 1 Frequencies of *UGT1A4* genotypes among Mexican and Spanish healthy volunteers

Genotype	Mexican-Mestizo (n = 248)				Spaniards (n = 318)			
	n	Observed frequency	95 % IC	Expected frequency†	n	Observed frequency	95 % CI	Expected frequency†
wt/wt	144	0.581	0.5184–0.6404	0.575	149	0.470	0.4144–0.5234	0.449
*wt/*1b*	27	0.109	0.0755–0.1542	0.116	72	0.226	0.1837–0.2756	0.234
*wt/*2*	11	0.044	0.0241–0.0786	0.052	28	0.088	0.0612–0.1247	0.093
*wt/*3b*	50	0.202	0.1562–0.2561	0.199	28	0.088	0.0612–0.1247	0.116
**1b/*1b*	3	0.012	0.0024–0.0366	0.006	9	0.028	0.0142–0.0537	0.030
**1b/*2*	1	0.004	0.0001–0.0248	0.005	6	0.019	0.0077–0.0415	0.024
**1b/*3b*	4	0.016	0.0048–0.0422	0.020	15	0.047	0.0282–0.0770	0.030
**2/*2*	0	0	0.0000–0.0184	0.001	2	0.006	0.0002–0.0242	0.005
**2/*3b*	5	0.020	0.0073–0.0477	0.009	6	0.019	0.0077–0.0415	0.012
**3b/*3b*	3	0.012	0.0024–0.0366	0.017	3	0.009	0.0019–0.0287	0.007

n number of subjects

† Calculated by Hardy–Weinberg law, (χ^2 test: MM $p = 0.3095$ and SP $p = 0.9527$)

Table 2 Frequencies of *UGT1A4* alleles among Mexican-Mestizo ($n = 248$) and Spanish ($n = 318$) healthy volunteers

UGT1A4	Mexican-Mestizo ($n = 248$)			Spaniards ($n = 318$)			
Alelles	*n*	Observed frequency	95 % IC	*n*	Observed frequency	95 % CI	*P* value†
wt	376	0.758	0.7184–0.7937	426	0.670	0.6292–0.7021	0.016
**1b*	38	0.076	0.0561–0.1036	111	0.174	0.1462–02051	0.0001
**2*	17	0.034	0.0211–0.0546	44	0.069	0.0515–0.0913	0.0113
**3b*	65	0.131	0.1040–0.1637	55	0.086	0.0707–0.1157	0.0193

N number of subjects, *MM* Mexican-Mestizos, *SP* Spaniards

† Fisher's exact test, $\alpha = 0.05$

Table 3 *UGT1A4* allelic frequencies in the Mexican Mestizo and Spanish populations compared with other population studies

Population studied	*n*	Allelic frequency *UGT1A4*2*	MM *p* value†	SP *p* value†	Allelic frequency *UGT1A4*3b*	MM *p* value†	SP *p* value†	Reference
Caucasian	92	8.8	0.0045	0.3376	11.0	0.2530	0.3835	[19]
German	363	8.0	0.0010	0.4094	9.0	0.0302	0.8487	[10]
French-Canadian	254	4.9	0.2712	0.1707	8.3	0.0141	0.8318	[1]
Asian	46	0.0	0.0891	0.0388	19.6	0.1051	0.0026	[19]
Japanese	256	0.0	0.0001	0.0001	12.9	0.8515	0.0206	[15]
Japanese	301	0.0	0.0001	0.0001	13.0	1.0000	0.0168	[20]
Japanese	100	0.0	0.0049	0.0001	16.5	0.2782	0.0023	[18]
Korean	50	0.0	0.0913	0.0023	12.0	0.8708	0.4740	[21]
Jordanian	216	6.5	0.0327	0.8050	3.5	0.0010	0.0003	[22]
African	59	0.0	0.0541	0.0009	9.0	0.3500	0.8590	[23]
Spaniard	318	6.9	0.0113		8.6	0.0193		This study
Mexican-Mestizo	248	3.4			13.1			

n number of subjects, *MM* Mexican-Mestizos, *SP* Spaniards

† Fisher's exact test, $\alpha = 0.05$

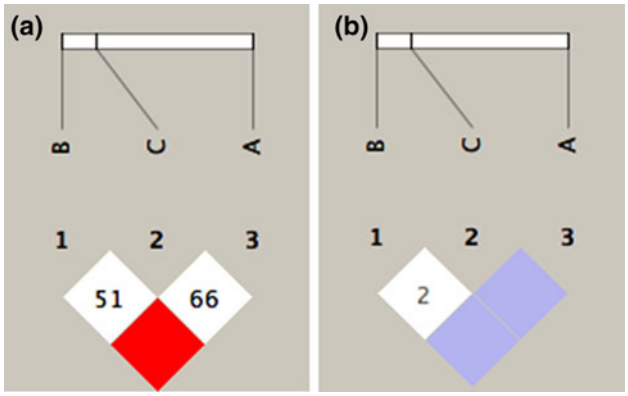


Fig. 1 Haplotype structure of *UGT1A4* allelic variants studied produced by Haploview software. (**a**) Spanish population; (**b**) Mexican population. (B = *UGT1A4**2; C = *UGT1A4**3b; A = *UGT1A4**1b), relative distances B–C = 72 nt, C–A = 392 nt, B–A = 401 nt. (nt = nucleotide). D′ values 0–1 are shown. White boxes: D′ < 1 and LOD < 2; blue boxes: D′ = 1 and LOD < 2; red boxes: D′ = 1 and LOD > 2. LOD = log odds score for linkage disequilibrium. D′ = 1 indicates that the two SNPs have not been separated by recombination. LOD > 2 indicates strong evidence of LD. Lower D′ values indicate some evidence of recombination

The synonymous C157C variant (*UGT1A4*1b*) was included in the present study because it showed high heterozygosis in an initial pre-screening. The *UGT1A4*1b* allele frequencies were different between MMs and SPs (Table 2). This is in agreement with the 1000 Genomes Project data, where a higher allele frequency of *UGT1A4*1b* was observed for Europeans (18 %) *vs.* admixed Americans (13 %). Indeed, this allele is very rare in Asian (1 %) and African (4 %) populations [23].

*UGT1A4*2* frequency was two times higher in SPs than in MMs. In contrast, *UGT1A4*3* was lower in SPs than in MMs. These allele frequencies also presented interethnic differences with other published populations (Table 3). *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* frequencies *in SPs* were similar to those reported in other Caucasian populations [1, 10, 19]. However, in MMs, the frequency of *UGT1A4*2* was lower and *UGT1A4*3* was higher than in several Caucasian populations. The frequencies of *UGT1A4*2* in SPs and MMs were higher than those observed in Asian populations [15, 18, 21], whereas the *UGT1A4*3* frequencies were lower in SPs but similar in MMs compared to Asians. In addition, the allele frequency of

*UGT1A4*2* in Jordanians was similar in SPs but higher than in MMs, while *UGT1A4*3* in Jordanians was two and three times lower than in SPs and MMs, respectively [22]. In Africans *UGT1A4*2* is absent [23], being higher in both SPs and MMs, whereas *UGT1A4*3* frequency was similar to both SPs and MMs observed frequencies.

In general, contrary to the relative homogeneity observed in SPs within Caucasians for *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3*, MMs exhibited differences when compared to Caucasians [10, 19]. While the *UGT1A4*2* frequencies were found to be similar in SPs and Jordanians, *UGT1A4*3* frequencies were similar among SPs, MMs and Africans and between MMs and Asians. Thus, the distribution of *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* in the MM population might be influenced by its admixture characteristics. Genetic admixture and diversity estimations in MM have been characterized, revealing a 69 % of Amerindian, 26 % of European, which comes mainly from Spain (Castilla, Andalucía, and Extremadura), and 5 % of African contribution [27].

The three analyzed SNPs variants in this genetic region indicated positive LD for *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* for the SP population. However, these variants are not in LD in the MM population, suggesting that these mutations have arisen independently in the same genetic background.

The substitutions P24T and L48 V have been observed to be in LD in Germans, but not in the French-Canadian population [10, 17]. The LD pattern observed in the French-Canadian population was similar to that in the MM. In contrast, Haploview analysis indicated positive LD between *UGT1A4*2* and *UGT1A4*3* variants for the SP population, in a manner similar to Germans. These allelic variants have been associated with reduced glucuronidation activities [10]. The discrepancies in LD pattern between SPs and MMs could be attributed to ethnic differences and additional studies must clarify whether this non-random association of these alleles may contribute to differences in the glucuronidation of UGT1A4.

Present data confirm that the three analyzed *UGT1A4* variants are highly polymorphic in the studied MM and SP populations. Functional variants of UGT1A4 have been shown to exhibit differences in glucuronidation capacity that may contribute significantly to interindividual variability in drug metabolism [11, 16]. Taking into account that UGT1A4 metabolizes many therapeutic drugs widely used in SPs and MMs, it is plausible to suggest that the observed genetic differences in both populations might partially explain differences in drug responses among them. In the light of these findings, we could hypothesize that drugs metabolized by UGT1A4 may show different profile of efficacy/adverse effects in MM and SP populations. Therefore, further research on different ethnic groups in America is warranted.

Acknowledgments The study has been partly supported by the Institute of Health Carlos III-FIS and the European Union (FEDER) Grants PI10/02758, PI10/02010 and CP06/00030 (P. Dorado) and from PRIS Extremadura, Consejería de Sanidad y Dependencia, FundeSalud PRIS10043 and PRIS11051 Gobierno de Extremadura AEXCID Cooperacion Extremeña (11IA002); by a Grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Mexico (CONACYT #167261) and was coordinated in the SIFF-RIBEF network (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenomica; www.ribef.com). The technical assistance of Esther Machín, Inés López and Beatriz Grillo is gratefully acknowledged.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ménard V, Girard H, Harvey M, Pérusse L, Guillemette C (2009) Analysis of inherited genetic variations at the UGT1 locus in the French-Canadian population. Hum Mutat 30:677–687
2. Bock KW (2010) Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. Biochem Pharmacol 80:771–777
3. Hahn KK, Wolff JJ, Kolesar JM (2006) Pharmacogenetics and irinotecan therapy. Am J Health Syst Pharm 63:2211–2217
4. Zhang W, Liu W, Innocenti F, Ratain MJ (2007) Searching for tissue-specific expression pattern-linked nucleotides of UGT1A isoforms. PLoS ONE 2:e396
5. Laverdière I, Caron P, Harvey M, Lévesque E, Guillemette C (2011) In vitro investigation of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for tacrolimus glucuronidation: predominant contribution of UGT1A4. Drug Metab Dispos 39:1127–1130
6. López M, Dorado P, Monroy N, Alonso ME, Jung-Cook H, Machín E, Peñas-Lledó E, Llerena A (2011) Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. Drug Metab Drug Interact 26:5–12
7. Kaivosaari S, Finel M, Koskinen M (2011) *N*-glucuronidation of drugs and other xenobiotics by human and animal UDP-glucuronosyltransferases. Xenobiotica 41:652–669
8. Mohamed ME, Frye RF (2011) Inhibitory effects of commonly used herbal extracts on UGT1A4, 1A6, and 1A9 enzyme activities. Drug Metab Dispos 39:1522–1528
9. Nakajima M, Sakata N, Ohashi N, Kume T, Yokoi T (2002) Involvement of multiple UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms in glucuronidation of 5-(4′-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human liver microsomes. Drug Metab Dispos 30:1250–1256
10. Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP (2004) Variation of hepatic glucuronidation: novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. Hepatology 39:970–977
11. Gulcebi MI, Ozkaynakcı A, Goren MZ, Aker RG, Ozkara C, Onat FY (2011) The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. Epilepsy Res 95:1–8
12. Erickson-Ridout KK, Zhu J, Lazarus P (2011) Olanzapine metabolism and the significance of UGT1A448V and UGT2B1067Y variants. Pharmacogenet Genomics 21:539–551
13. Zhou J, Argikar UA, Remmel RP (2011) Functional analysis of UGT1A4 (P24T) and UGT1A4 (L48 V) variant enzymes. Pharmacogenomics 12:1671–1679

14. Wiener D, Doerge DR, Fang JL, Upadhyaya P, Lazarus P (2004) Characterization of *N*-glucuronidation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in human liver: importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A4. Drug Metab Dispos 32:72–79
15. Saeki M, Saito Y, Jinno H et al (2005) Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. Drug Metab Pharmacokinet 20:144–151
16. Ghotbi R, Mannheimer B, Aklillu E et al (2010) Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. Eur J Clin Pharmacol 66:465–474
17. Benoit-Biancamano MO, Adam JP, Bernard O, Court MH, Leblanc MH, Caron P, Guillemette C (2009) A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. Pharmacogenet Genomics 19:945–954
18. Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y (2005) UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. Drug Metab Dispos 33:672–675
19. Thomas SS, Li SS, Lampe JW, Potter JD, Bigler J (2006) Genetic variability, haplotypes, and htSNPs for exons 1 at the human UGT1A locus. Hum Mut 27:717
20. Saeki M, Saito Y, Jinno H et al (2006) Haplotype structures of the UGT1A gene complex in a Japanese population. Pharmacogenomics J 6:63–75
21. Yea SS, Lee SS, Kim WY, Liu KH, Kim H et al (2008) Genetic variations and haplotypes of UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in a Korean population. Ther Drug Monit 30:23–34
22. Hakooz N, Alzubiedi S, Yousef AM, Arafat T, Dajani R, Ababneh N, Ismail S (2012) UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) polymorphisms in a Jordanian population. Mol Biol Rep 39:7763–7768
23. 1000 Genomes Project. http://www.1000genomes.org/
24. http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A4.htm
25. Haploview v4.0 software. http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview
26. Phase v2.1 software. http://www.stat.washington.edu/stephens/phase/download.html
27. Juárez-Cedillo T, Zúñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM et al (2008) Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican-Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. Forensic Sci Int Genet 2:e37–e39

Preliminary Communication
For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pharmacogenomics

Relationship between the *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism and high losartan hydroxylation in healthy Ecuadorian volunteers

Aim: The *CYP2C9* IVS8-109T allele was recently found to be more frequent among Swedish individuals, who have the highest losartan metabolic ratio (MR; losartan:E-3174). Thus, the influence of the *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism on the losartan MR was evaluated among healthy Ecuadorians. In addition, the frequency of the *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism was determined. **Results:** Among *CYP2C9*-homozygous wild-types, those with the *CYP2C9* IVS8-109T/T versus A/A genotypes had a lower MR ($p < 0.05$). Furthermore, the frequency of the *CYP2C9* IVS8-109T variant was lower in Ecuadorians (21.4%; $p < 0.001$) than in populations from Sweden or Asia (ranging from 32 to 46%). **Conclusion:** In this Ecuadorian population, the *CYP2C9* IVS8-109T allele was associated with an increased CYP2C9 hydroxylation capacity. Further investigation needs to be carried out in order to clarify the relevance of the SNP of *CYP2C9* IVS8-109A>T on losartan hydroxylation across populations and its potential implications in CYP2C9 activity.

Original submitted 19 February 2014; Revision submitted 16 May 2014

Keywords: *CYP2C9* • intronic polymorphism • IVS8-109A>T • losartan

Pedro Dorado[1,2], Alicia Gallego[1], Eva Peñas-LLedó[1], Enrique Terán[3] & Adrián LLerena*[,1,4]
[1]CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital & Medical School, Servicio Extremeño de Salud, Badajoz 06080, Spain
[2]University of Extremadura, CU Plasencia, Spain
[3]Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador
[4]Instituto de Salud CIII, CIBERSAM, Madrid, Spain
*Author for correspondence:
Tel.: +34 924 218 040
Fax: +34 924 219 881
allerena@unex.es

The *CYP2C9* intronic SNP IVS8-109A>T (rs1934969) has been found to be linked with other *CYP2C9* SNPs in the 5′-UTR and exon and intron 1 in a Japanese population. This SNP IVS8-109A>T is also contained in different *CYP2C9* haplotypes that are present in Japanese and Korean populations [1,2].

CYP2C9 genetic polymorphism is related to the losartan metabolic ratio (MR; losartan:E-3174) [3]. Furthermore, the association of this SNP with a higher losartan MR has been described in healthy volunteers from Sweden [4]. In particular, the subjects carrying the T allele were found to be more common among the 20 Swedish individuals with the highest losartan MRs in comparison to another 20 individuals with the lowest MRs. However, an association between a higher frequency of the T allele in those with the highest MRs was only seen in the Swedish individuals, but not in Koreans [4]. When comparing the MRs of the Swedish subjects with those of Koreans, the latter had lower MRs.

Therefore, the present study was aimed at evaluating whether the *CYP2C9* IVS8-109A>T intronic polymorphism influenced losartan MR in healthy Ecuadorian volunteers. In addition, the frequency of the *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism was compared with published frequencies from Caucasian and Asian populations.

Materials & methods

The *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism was determined in 187 unrelated Ecuadorian subjects (57% females; 21 ± 4 years of age) who had already participated in a study regarding the influence of *CYP2C9* genotypes on losartan hydroxylation capacity [5]. In the previous study, the *CYP2C9* alleles **2, *3, *4, *5* and **6* were analyzed [5], and losartan urinary MR was calculated with a specific high-performance liquid chromatography

Future Medicine part of fsg

method [6]. Those classified as wild-type (*CYP2C9*1/*1*; n = 161) were selected for the analysis of the influence of *CYP2C9* IVS8-109A>T on losartan MR.

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent, and the research was approved by the Bioethics Committee of the Central University of Ecuador [5].

CYP2C9 IVS8-109A>T genotyping

The *CYP2C9* IVS8-109A>T intronic polymorphism (rs1934969) was analyzed by a PCR-RFLP method. The PCRs were performed on a Mastercycler® 384 (Eppendorf AG, Germany) in order to identify the presence of the *CYP2C9* IVS8-109A>T polymorphism.

The amplification was carried out in 25-µl reactions containing 0.5 U EcoTaq polymerase (Ecogen, Spain), 0.8 µM of each primer (forward: CTGTTAAGATCTGATATTAGG; reverse: TGAAACATAGGAAACTCTCCG) [3], 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphate (set PCR grade; Roche Diagnostics GmbH, Germany), 2 mM of $MgCl_2$ and 1 µl of DNA template. The cycling conditions were: 8 min denaturation at 95°C; 35 cycles of 95°C for 30 s, 54°C for 30 s and 72°C for 30 s; and a final extension step of 7 min at 72°C. This PCR reaction generated a fragment of 622 bp.

Subsequently, 20 µl of restriction mix containing restriction buffer and 10 U of *Hinf*I restriction enzyme (New England Biolabs, UK) was added to the 2-µl PCR reaction followed by overnight incubation in order to attain complete digestion to 37°C. The PCR product was then analyzed directly by 2% agarose gel electrophoresis. The DNA was visualized with ethidium bromide. The *CYP2C9* IVS8-109T alleles were cut into fragments of 468 and 154 bp, whereas the *CYP2C9* IVS8-109A alleles were uncut (622 bp).

Statistics

Mann–Whitney U tests were used to compare the losartan MRs between different *CYP2C9* IVS8-109A>T genotype groups, and Kruskal–Wallis analysis of variance was used to compare the losartan MRs between all of

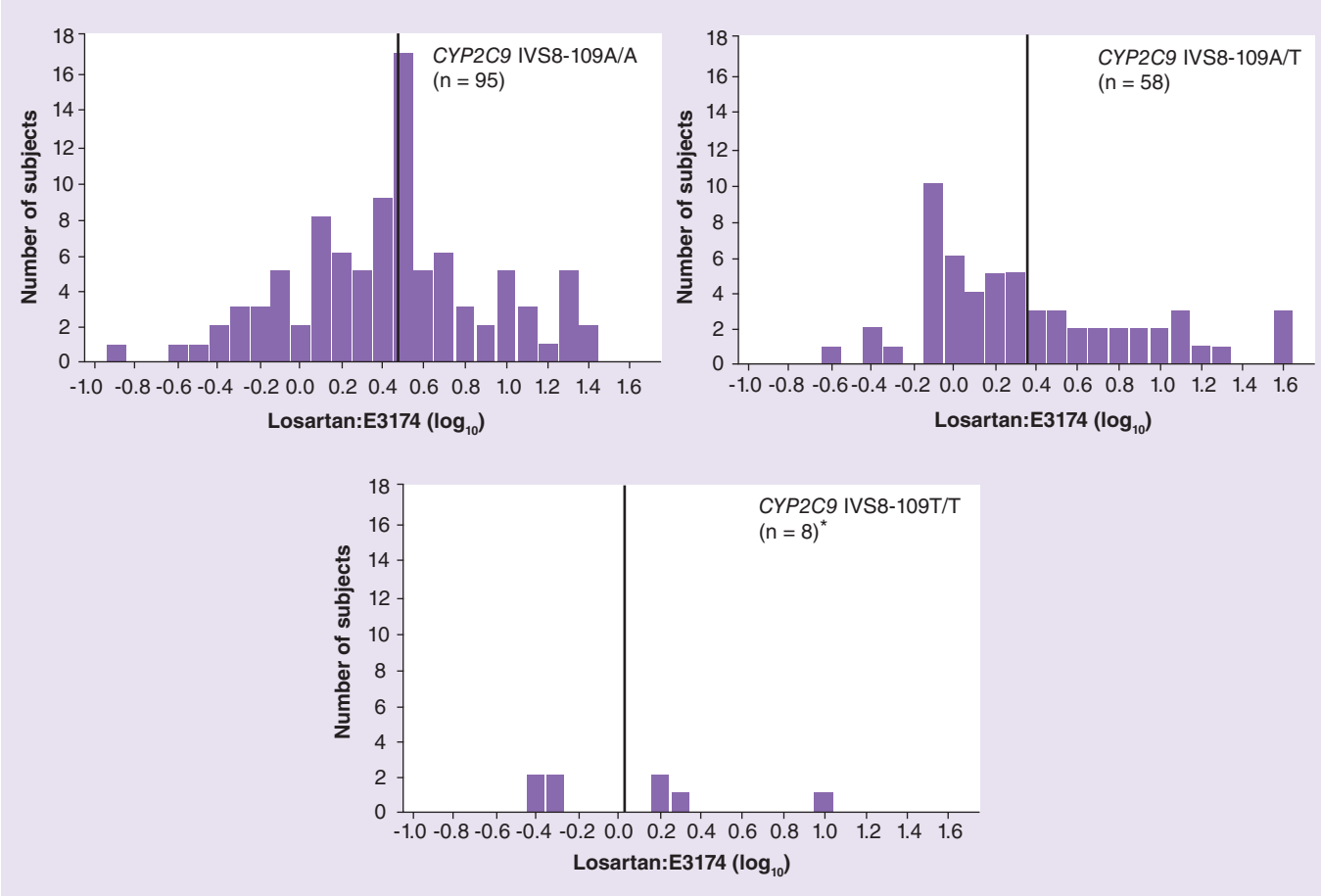


Figure 1. Histograms with the frequency distributions of losartan:E-3174 (log_{10}) metabolic ratios across healthy Ecuadorian volunteers with different *CYP2C9* IVS8-109A>T genotypes (n = 161). The vertical black line shows the mean of the losartan:E-3174 (log_{10}) metabolic ratio among each group.
*p = 0.0209 compared with the *CYP2C9* IVS8-109A/A group according to the Mann–Whitney U test.

Table 1. *CYP2C9* IVS8-109A>T genotype and allele frequencies in different populations.

Population (n)	AA allele frequency (n, 95% CI)	AT allele frequency (n, 95% CI)	TT allele frequency (n, 95% CI)	T allele frequency (n†, 95% CI)	Ref.
Japanese (263)	0.285 (75, 0.234–0.343)	0.517 (136, 0.457–0.577)	0.198 (52, 0.154–0.250)	0.456‡ (240, 0.414–0.499)	[1]
Koreans (50)	0.340 (17, 0.224–0.479)	0.480 (24, 0.348–0.615)	0.180 (9, 0.095–0.310)	0.420‡ (42, 0.328–0.518)	[2]
Koreans (128)	0.406 (52, 0.325–0.493)	0.445 (57, 0.362–0.532)	0.148 (19, 0.096–0.221)	0.371§ (95, 0.314–0.432)	[4]
Swedes (85)	0.494 (42, 0.390–0.598)	0.376 (32, 0.281–0.483)	0.129 (11, 0.072–0.219)	0.318§ (54, 0.252–0.391)	[4]
Ecuadorians (187)	0.615 (115, 0.543–0.682)	0.342 (64, 0.278–0.413)	0.043 (8, 0.020–0.083)	0.214 (80, 0.175–0.258)	Current study

†Number of alleles.
‡$p < 0.0001$ compared with Ecuadorians by Fisher's exact tests.
§$p < 0.05$ compared with Ecuadorians by Fisher's exact tests.

the different *CYP2C9* IVS8-109A>T genotype groups. Hardy–Weinberg equilibria were determined by comparing the genotype frequencies with the expected values using a contingency table χ^2 statistic with Yates's correction. Fisher's exact tests were used to compare differences in *CYP2C9* IVS8-109A>T allele frequencies. p-values less than 0.05 were regarded as statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results

The losartan MRs were significantly different between the *CYP2C9* IVS8-109A>T genotype groups ($p = 0.043$; $n = 161$). Furthermore, the MRs were higher ($p = 0.021$) in subjects with the IVS8-109A/A genotype (mean ± standard deviation: 4.8 ± 5.8; n = 95) than in subjects with the T/T genotype (2.3 ± 3.7; n = 8; Figure 1).

The *CYP2C9* IVS8-109A>T genotype frequencies (Table 1) in this population corresponded to those predicted by the Hardy–Weinberg equation (χ^2 test, $p > 0.05$). Moreover, the frequency of the IVS8-109T variant in this Ecuadorian population (21.4%) was significantly lower ($p < 0.001$) than in other previously studied populations (Table 1).

Discussion & conclusion

The present findings show that the IVS8-109T allele is associated with increased CYP2C9 activity in this healthy population of Ecuadorian subjects. However, this result appears to contradict a previous report in healthy Swedish individuals showing that the IVS8-109T allele was more frequent among the group of 20 individuals with the highest losartan MRs [4].

The IVS8-109A>T SNP has been found to be linked with other SNPs in the 5′-UTR and exon and intron 1 of the *CYP2C9* gene [1]. Moreover, the IVS8-109A>T SNP is also located in different *CYP2C9* haplotypes that are present in Japanese and Korean populations [1,2], as shown when evaluating the association between *CYP2C9* haplotypes and warfarin sensitivity, where the IVS8-109A>T SNP was not the one influencing warfarin sensitivity [2]. Therefore, the potential effect of the IVS8-109A>T SNP on CYP2C9 activity could be due to linkage with others SNPs that could, in turn, differ across populations.

This discrepancy between the two populations of Ecuadorians and Swedes could be due to differences in genetic background. In particular, there might exist differences in linkage disequilibrium structures between them, which would suggest that the alterations in CYP2C9 activity are not caused by *CYP2C9* IVS8-109T intronic variants themselves, but rather by those alleles linked with it.

Besides this potential linkage, only wild-type homozygous subjects were selected to be studied both in Swedes and Ecuadorians. Since the Ecuadorians represent an admixed population of mostly Amerindian and Hispanic–European background, the existence of some unknown alleles cannot be ruled out in the present population.

The discrepancy between the relationship of this SNP with low CYP2C9 activity in Swedes and with high CYP2C9 activity in Ecuadorians could be due to the aforementioned factors related to genetic background, but also to differences in the phenotyping results. In keeping with this, we have already pointed out that the mean losartan MR was significantly lower among *CYP2C9*-homozygous wild-type Swedes than Ecuadorians (0.9 ± 1.7 vs 4.5 ± 4.7, respectively), suggesting that Ecuadorians have a lower CYP2C9

capacity [5]. This difference in the mean losartan MR values cannot be explained by genotyping differences, since all of the selected individuals were wild-type (*CYP2C9*1/*1*), defined as those not carrying the *2 and *3 alleles. Despite the present study also analyzing the *4, *5 and *6 alleles, their frequency was null in the present population. Therefore, other known or unknown alleles could be influencing these findings.

However, differences existed in the phenotyping methods used to analyze losartan and its metabolite (E-3174) between these studies. While the phenotyping method used in the present study consisted of a single dose of losartan [6], the 'Karolinska cocktail' that evaluated Koreans and Swedes not only consists of a dose of losartan, but also of other CYP450-specific probe drugs simultaneously [4].

The frequency of the IVS8-109A>T SNP has been evaluated in very few populations so far (Table 1). It is of note that among the studies that have analyzed the frequency of IVS8-109A>T (Swedes and three Asian populations), this allele shows the lowest frequency in Ecuadorians and the highest in Japanese [1]. It should also be noted that the number of subjects with the IVS8-109TT genotype is small in the three populations in which the influence of this SNP on the losartan MR has been evaluated (eight Ecuadorians, 11 Swedes and 19 Koreans).

In summary, the contradictory findings regarding the relationship between the IVS8-109A>T SNP and the losartan MR in Swedes and Ecuadorians could be due to genetic differences between the two populations, which might be related to a potential linkage disequilibrium. Another potential factor is the overall difference in the mean losartan hydroxylation capacity between the two populations.

In conclusion, this study shows that the IVS8-109T allele is associated with a higher CYP2C9 metabolic capacity in this Hispanic population. The present data do not support those previously reported in a Swedish population; therefore, the association vetween this SNP and the losartan MR needs to be clarified, and a molecular explanation for the increased CYP2C9 metabolism remains to be established.

Future perspective

The evaluation of CYP2C9 hydroxylation capacity is important for personalized drug treatment. While enzyme activity is commonly assessed only from *CYP2C9*2* and *3 alleles, additional SNPs, including the novel *CYP2C9* intronic polymorphism IVS8-109A>T, must be taken into consideration. However, the potential effect of the IVS8-109A>T SNP on CYP2C9 activity could be due to linkage with other SNPs. Therefore, further studies into the association of this allele with ultra-rapid drug metabolism, both in healthy volunteers and patients and with other CYP2C9 substrates, must be carried out in order to clarify these contradictory findings.

Financial & competing interests disclosure

The study has been partly supported by the Institute of Health Carlos III-FIS and the European Union (FEDER) grant PI10/02758; Gobierno de Extremadura and AEXCID Cooperación Extremeña (13IA001); and coordinated in the Ribef Iberoamerican Network of Pharmacogenetics (SIFF). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary

- The metabolic ratio of losartan:E-3174 was higher ($p < 0.05$) in subjects with the *CYP2C9* IVS8-109A/A genotype than in subjects with the T/T genotype.
- The frequency of the *CYP2C9* IVS8-109T variant in the Ecuadorian population (21.4%) was lower ($p < 0.001$) than the frequencies observed in previously studied populations.

References

Papers of special note have beenhighlighted as:
• of interest; •• of considerable interest

1 Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M *et al.* Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese. *Pharmacogenet. Genomics* 16(7), 497–514 (2006).
• **First study in which the SNP *CYP2C9* IVS8-109T was described.**

2 Lee SJ, Jang YJ, Cha EY, Kim HS, Lee SS, Shin JG. A haplotype of *CYP2C9* associated with warfarin sensitivity in mechanical heart valve replacement patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 70(2), 213–221 (2010).

3 Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G *et al.* Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the *CYP2C9* genotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* 71(1), 89–98 (2002).

4 Hatta FH, Teh LK, Helldén A *et al.* Search for the molecular basis of ultra-rapid CYP2C9-catalysed metabolism: relationship between SNP IVS8-109A>T and the losartan metabolism phenotype in Swedes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68(7), 1033–1042 (2012).

•• **First study in which the SNP *CYP2C9* IVS8-109T allele was associated with a higher losartan metabolic ratio in healthy Swedish subjects, but not in Koreans.**

5 Dorado P, Beltrán LJ, Machín E *et al.* Losartan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population: influence of *CYP2C9* genetic polymorphism, habits and gender. *Pharmacogenomics* 13(15), 1711–1717 (2012).

•• **Previously studied population of Ecuadorian healthy volunteers in whom the influence of *CYP2C9* genetic polymorphisms on the losartan:E-3174 metabolic ratio was evaluated.**

6 Dorado P, Machín E, de Andrés F *et al.* Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes. *Drug Metabol. Drug Interact.* 27(4), 217–233 (2012).