



TESIS DOCTORAL

METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6: VARIABILIDAD EN POBLACIONES IBEROAMERICANAS E IMPLICACIÓN CLÍNICA EN SALUD MENTAL

MARÍA EUGENIA GONZÁLEZ NARANJO

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

2015

TESIS DOCTORAL

**METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6:
VARIABILIDAD EN POBLACIONES IBEROAMERICANAS E
IMPLICACIÓN CLÍNICA EN SALUD MENTAL**

MARÍA EUGENIA GONZÁLEZ NARANJO

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

CONFORMIDAD DE LOS DIRECTORES:

Adrián LLerena Ruiz y Eva M^a Peñas Lledó

CERTIFICAMOS QUE: El trabajo de investigación titulado "**METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6: VARIABILIDAD EN POBLACIONES IBEROAMERICANAS E IMPLICACIÓN CLÍNICA EN SALUD MENTAL**" que presenta **M^a Eugenia González Naranjo** 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: Eva Peñas Lledó

A los que ahora no están, pero nunca se fueron del todo

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	13
1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA: LA SUPERFAMILIA DE ENZIMAS DEL CITOCROMO P450 (CYP).....	15
2. EL CITOCROMO P450 2D6 (CYP2D6).....	17
2.1. La enzima CYP2D6	17
2.2. Bases moleculares y polimorfismos de <i>CYP2D6</i>	18
3. CAPACIDAD HIDROXILADORA O FENOTIPO METABÓLICO DE CYP2D6.....	20
3.1. Medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 mediante la administración de uno o varios fármacos test.....	21
3.2. Medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 mediante el uso de la monitorización terapéutica de fármacos	25
3.3. Estimación del fenotipo metabólico CYP2D6 a partir del genotipo <i>CYP2D6</i>	27
4. RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD HIDROXILADORA DE CYP2D6 MEDIDA POR ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO TEST Y LA ESTIMADA A PARTIR DEL GENOTIPO <i>CYP2D6</i>	29
4.1. Discordancia entre gUMs y mUMs: estudios de poblaciones.	29
4.2. Discordancia entre gUMs y mUMs: posible asociación del SNP <i>CYP2D6</i> -1584C>G con el metabolismo ultrarrápido CYP2D6.....	31
5. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DE CYP2D6.....	32
5.1 Variabilidad interétnica de CYP2D6 en poblaciones mundiales.....	32
5.2. Variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas.	34
6. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6.....	37
6.1. Relación entre la variabilidad de la capacidad funcional de CYP2D6 y el metabolismo de fármacos mediado por CYP2D6	37
6.2. CYP2D6 y psicopatología	40
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
1. JUSTIFICACIÓN	45

2. ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS	48
3. OBJETIVO GENERAL	51
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
III. MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	55
2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN.....	56
2.1. Análisis genético <i>CYP2D6</i>	56
2.2. Desarrollo de un método para analizar las concentraciones de aripiprazol y su principal metabolito dehidroaripiprazol	57
3. METODOLOGÍA.....	58
3.1. Propuesta de un cóctel de fenotipación	58
3.2. Análisis genético del <i>CYP2D6</i>	58
3.3. Determinación de los fenotipos metabólicos estimados a partir del genotipo <i>CYP2D6</i>	63
3.4. Asignación del origen étnico de cada individuo	64
3.5. Medida de la capacidad hidroxiladora del <i>CYP2D6</i> a partir de la administración del fármaco test debrisoquina.....	64
3.6. Análisis cromatográfico de aripiprazol y su metabolito.....	65
3.7. Evaluación del riesgo de desarrollar síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario.....	66
3.8. Evaluación de la historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario.....	67
3.9. Evaluación de la discontinuación del tratamiento antidepresivo en pacientes diagnosticados con depresión mayor.....	67
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	67
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	68
IV. RESULTADOS.....	71
BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA <i>CYP2D6</i>	73
Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas <i>CYP1A2</i> , <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2D6</i> y <i>CYP3A4</i>	73
BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE <i>CYP2D6</i>	78

Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México	78
Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de España.....	79
Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal.....	83
Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas	83
BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	85
Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba	85
Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México	86
Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México	87
 V. DISCUSIÓN.....	89
BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.	91
Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4.....	91
BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	98
Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México	98
Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de España.....	99
Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal.....	102
Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas	103
BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	106

Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba	106
Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México	108
Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México	110
DISCUSIÓN GENERAL	111
VI. CONCLUSIONES.....	117
1. CONCLUSIÓN GENERAL	119
2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	119
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	123
VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN.....	143
1. AGRADECIMIENTOS	145
2. FINANCIACIÓN.....	147
IX. ANEXOS	149
1. ÍNDICE DE TABLAS	151
2. ÍNDICE DE FIGURAS	153
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	155
4. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL.....	157

RESUMEN

Introducción: Se ha descrito la existencia de individuos con capacidad hidroxiladora de CYP2D6 nula (metabolizadores lentos o PMs) e incrementada (metabolizadores ultrarrápidos o UMs).

1. Fenotipos metabólicos. La capacidad hidroxiladora de este citocromo puede ser evaluada mediante metodologías diferentes, siendo esta una de las barreras para su implementación clínica.

1.1. En voluntarios sanos se ha utilizado regularmente la administración de un fármaco test en métodos de fenotipado selectivos o mediante la utilización de cócteles de fenotipación, que permiten medir la capacidad metabólica de varias enzimas CYP simultáneamente. De esta manera un individuo puede ser clasificado como mPM o mUM.

1.2. Además, tanto en voluntarios sanos como en pacientes en tratamiento, la caracterización del fenotipo metabólico puede ser realizada a partir del genotipo *CYP2D6*, asignando a los individuos portadores de dos alelos *CYP2D6* sin actividad el fenotipo extrapolado del genotipo gPM y a aquellos con más de dos genes activos *CYP2D6* el fenotipo extrapolado gUM. Aunque la determinación de los individuos gPMs predice con mucha exactitud los mPMs (relación feno/genotipo metabólico), solo entre el 10% y el 40% de los mUMs pueden predecirse a partir del genotipo. Entre los posibles factores causantes de esta falta de ajuste se encuentran factores ambientales, epigenéticos o la existencia de polimorfismos desconocidos o no estudiados. Entre ellos, el SNP *CYP2D6* -1584C>G se ha relacionado *in vitro* con mayor expresión de *CYP2D6* e *in vivo* con mayor capacidad hidroxiladora en pacientes. Asimismo, se ha encontrado ligado a la variación *CYP2D6* 31G>A en muchos sujetos mUMs que no contenían multiplicaciones de *CYP2D6*. Por todo ello, evaluar su implicación funcional podría ser de interés, y ser de utilidad para ajustar la predicción del fenotipo metabólico a partir de la caracterización genotípica.

1.3. Un problema adicional se plantea en la caracterización metabólica de pacientes en tratamiento con sustratos *CYP2D6*, debido a que a partir de cierta dosis y dependiendo del genotipo se produce una fenocopia. Por tanto, presentan limitaciones tanto la estrategia de fármaco test como la caracterización genotípica, que solo sería válida para los PMs. A pesar de esto, y especialmente durante el tratamiento con sustratos *CYP2D6*, sería relevante la determinación de la capacidad metabólica de *CYP2D6* en pacientes, con el fin de identificar la posible inhibición de *CYP2D6* y, por tanto, el cambio de status metabólico. En esta situación, la

medición de niveles plasmáticos, en el contexto de la monitorización terapéutica de fármacos (TDM) puede ser utilizada como una medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6. Esta estrategia ha sido evaluada para medir las interacciones entre fármacos en pacientes durante politerapia farmacológica tratados con amitriptilina, tioridazina o risperidona, sustratos todos de la enzima CYP2D6. Por tanto podría ser válida en pacientes en tratamiento farmacológico para la determinación de la capacidad metabólica.

2. Variabilidad interétnica. Al margen de la disponibilidad de las metodologías adecuadas para cada situación, otro aspecto relevante sería la existencia en algunas poblaciones de una mayor frecuencia de grupos metabólicos de riesgo, entre ellos los UMs de CYP2D6. Esta hipótesis se basa en la observación de que las frecuencias alélicas, así como de UMs, varían entre poblaciones con diferente origen étnico. *CYP2D6*4* se ha descrito más frecuentemente en poblaciones de origen caucásico, *CYP2D6*10* en poblaciones orientales, *CYP2D6*17* y **29* en poblaciones de origen africano y, por último, *CYP2D6*41* y las multiplicaciones del gen *CYP2D6* en poblaciones de Oriente Medio. En concordancia con estos datos, los PMs se dan con mayor frecuencia en población caucásica, mientras que los gUMs son más abundantes en poblaciones de Oriente Medio, que son poblaciones relacionadas con la Península Ibérica y, por tanto, con el componente caucásico de la población latinoamericana. Por todo ello, parece conveniente analizar si esta potencial sobrerrepresentación de UMs en la península ibérica se da en algún grupo poblacional de Iberoamérica.

3. Implicación clínica en salud mental. La disponibilidad de metodologías adecuadas para la evaluación del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6, así como su potencial alta incidencia en algunas poblaciones, facilitaría su implementación en determinadas situaciones clínicas. En este sentido, se ha mostrado que la frecuencia de genes activos CYP2D6 multiplicados es mayor en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario (TCAs) que en controles sanos. Además, el UM de CYP2D6 se ha relacionado con el Suicidio y con la no respuesta al tratamiento antidepresivo.

Por tanto la presente Tesis Doctoral se plantea analizar la relación del grupo de UMs como factor de riesgo en psicopatología (TCAs y Suicidio) y en fallo en respuesta a tratamiento antidepresivo. Asumiendo la hipótesis de su interés clínico, se plantea analizar su potencial relevancia epidemiológica analizando para ello la posible existencia de grupos poblacionales con una alta proporción de UMs en base a su origen ancestral. Por último asumida su relevancia clínica e importancia epidemiológica en determinadas poblaciones, la barrera para su implementación

clínica vendría determinada por la disponibilidad de la metodología adecuada para la caracterización de los grupos metabólicos de riesgo (UMs). Estos tres aspectos se han organizado en tres bloques de estudios: metodología para la caracterización metabólica (Bloque 1), variabilidad interétnica en Iberoamérica (Bloque 2) y relevancia clínica (Bloque 3)

Objetivos: La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal (OG1) desarrollar propuestas metodológicas para evaluar el fenotipo metabólico de CYP2D6 en distintas situaciones, mediante la propuesta de un cóctel de fenotipación que mida la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 simultáneamente con otros CYPs (Estudio I), la optimización de los datos de genotipo mediante el estudio de la relación entre el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G y la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 (Estudio II) y la utilización del índice metabólico de un fármaco administrado con fines terapéuticos, en concreto aripiprazol (Estudio III). En segundo lugar, la Tesis Doctoral se propone (OG2) evaluar la frecuencia de UMs en poblaciones iberoamericanas, nativas americanas de México (Estudio IV), en una población de España (Estudio V), otra de Portugal (Estudio VI) y en un estudio general de la población iberoamericana (consorcio CEIBA de la Red RIBEF) agrupadas por su origen étnico (Estudio VII). Por último, se plantea (OG3) estudiar la implicación clínica en Salud Mental de los UM CYP2D6, especialmente su relación con TCAs (Estudio VIII), historia de tentativa suicida (Estudio IX) y abandono del tratamiento antidepresivo (Estudio X).

Materiales y Métodos: En total se han estudiado 5555 individuos de 12 países iberoamericanos, de los cuales 5229 fueron voluntarios sanos y 326 pacientes. La propuesta de cóctel de fenotipación CEIBA se realizó en base a un análisis de resultados publicados. La determinación de los alelos *CYP2D6**2, *3, *4, *6, *10, *17, *29, *35 y *41, así como el número de copias del gen *CYP2D6*, se realizó mediante PCR-RT con ensayos TaqMan®. Además, la determinación de *CYP2D6**5 y la multiplicación del gen fue evaluada mediante XL-PCR. Asimismo, en el caso de multiplicación de *CYP2D6*, se determinó si dicha multiplicación pertenecía a un alelo activo o no mediante PCR-RFLP. Los análisis de niveles plasmáticos se han realizado por HPLC con detector ultravioleta. La pertenencia de los individuos a cada grupo étnico fue indicada según autoasignación. La escala EDI se utilizó para evaluar el riesgo de síntomas de TCAs, mientras que una entrevista diagnóstica se utilizó para determinar la presencia o no de una historia de tentativa suicida entre los pacientes con TCAs.

Resultados: Se propone la utilización de 100 mg de cafeína, 25 mg de losartán, 20 mg de omeprazol y 30 mg de dextrometorfano en un cóctel de fenotipación para medir simultáneamente

la capacidad hidroxiladora de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4. Los individuos con uno o dos genes activos *CYP2D6* y portadores de la variante *CYP2D6* -1584G muestran un índice metabólico de debrisoquina mayor que los sujetos no portadores de esta variante. Además, los pacientes en tratamiento con aripiprazol junto a inhibidores de *CYP2D6* muestran un índice metabólico de aripiprazol mayor que aquellos con dos genes activos o que no están en tratamiento con inhibidores *CYP2D6*.

En relación a la variabilidad del UM de *CYP2D6*, la frecuencia de genes activos *CYP2D6* multiplicados fluctuó entre 4.3% y 10.7% en ocho poblaciones amerindias de México, fue de 3.7% en la población española, de 3.0% en la población de Portugal, y .de 3.9%, 3.5%, 6.0%, 6.4% y 3.8% en las poblaciones iberoamericanas amerindia, caucásica, africana, judía Ashkenazi y mestiza, respectivamente. Por su parte, la frecuencia de gUMs varió entre 5.4% y 20.6% en ocho poblaciones amerindias de México, fue de 5.3% en la población española, de 4.7% en la población de Portugal, y .de 7.3%, 5.4%, 8.4%, 11.6% y 6.6% en las poblaciones iberoamericanas amerindia, caucásica, africana, judía Ashkenazi y mestiza, respectivamente.

Por último en una población de mujeres sanas de Cuba se ha encontrado que aquellas con más riesgo de desarrollar síntomas relacionados con la bulimia nerviosa mostraban una mayor frecuencia de mUMs de *CYP2D6* y una menor de mPMs. Además, la frecuencia de gUMs fue mayor en una subpoblación de pacientes diagnosticados con bulimia nerviosa purgativa e historia de tentativa suicida (33.3%) que entre aquellas con un diagnóstico similar pero sin intento de suicidio previo (8.5%). Finalmente, en un grupo de pacientes diagnosticados con depresión mayor y tratados en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina se encontró que todos los gUMs dejaron el tratamiento en las cuatro primeras semanas, mientras que ningún gPM lo dejó durante las doce semanas de seguimiento.

Discusión y conclusiones: Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran la implicación clínica del metabolismo ultrarápido *CYP2D6*, así como su variabilidad interétnica, proponiéndose además metodologías para su determinación en diferentes situaciones. Los estudios del Bloque 3 muestran la relación de los *CYP2D6* UMs con el riesgo de TCA en población sana, de suicidio en pacientes y de abandono del tratamiento con antidepresivos, apoyando así resultados previos. Por su parte, los estudios del Bloque 2 muestran la amplia variabilidad de este grupo metabólico en poblaciones con diferente origen étnico, apoyando datos previos que indicaban una alta frecuencia de gUMs en población judía, Sin embargo, estos datos no apoyan la alta frecuencia de gUMs descrita en poblaciones de la Península Ibérica. Por

último, se proponen diferentes formas de objetivar el grupo UM de CYP2D6: mediante un fármaco test asociado a otros en un cóctel (CEIBA) diseñado para poblaciones Iberoamericanas, la optimización de la relación fenotipo/genotipo (adicionando un SNP) o durante la monitorización terapéutica, los resultados obtenidos con aripiprazol están en consonancia con los previos con tioridacina o risperidona.

En conclusión, los estudios de la presente Tesis Doctoral muestran C1) que un cóctel de 4 fármacos puede ser de utilidad para la evaluación de los CYPs principales, que la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 se ve afectada por la presencia de la variante *CYP2D6* -1584C>G y la toma de inhibidores CYP2D6, y el uso del índice metabólico aripiprazol/metabolito principal en pacientes para objetivar la capacidad metabólica; C2) que existe variabilidad en las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y gUMs en poblaciones iberoamericanas de diferente origen étnico, con una alta frecuencia en una población de origen judío y algunas amerindias; la frecuencia de UMs es similar en España y Portugal, con una frecuencia de CYP2D6 UMs diferente a la publicada; C3) por último, que el metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 puede relacionarse con el riesgo de desarrollar síntomas relacionados con bulimia nerviosa en voluntarias sanas, con una historia de tentativa suicida en pacientes con bulimia nerviosa purgativa y con el abandono del tratamiento antidepresivo (fluoxetina o amitriptilina) en pacientes con depresión mayor, lo que podría justificar, al menos en parte, su potencial implicación con el suicidio.

CYP2D6 ULTRARAPID METABOLISM: INTERETHNIC VARIABILITY AMONG IBEROAMERICAN POPULATIONS AND CLINICAL RELEVANCE FOR MENTAL HEALTH

ABSTRACT

Introduction: There is interindividual and interethnic variability in relation to CYP2D6 hydroxylation enzyme capacity existing individuals with null (poor metabolizers, PMs) or increased (ultra-rapid metabolizers, UMs) CYP2D6 activity, which has clinical implications. In keeping with this, there are several aspects that are essential to be taken into account for clinically implementing the detection of these groups of risk.

1. Metabolic Phenotype. The most important one relates to the use of the method to detect these groups. Nowadays, different methods are available to measure CYP2D6 enzyme hydroxylation capacity, which represents a barrier to its clinical implementation. Indeed, one of them, consisting of DNA isolation, can be used for clinical patients and healthy volunteers, but the remaining ones are specific for each population.

1.1. In healthy volunteers, metabolic (m) phenotyping methods allow classifying individuals into mPMs and mUMs and are accomplished by the selective administration of a drug test or a cocktail of drugs.

1.2. In healthy volunteer and clinical populations, CYP2D6 polymorphic metabolic groups can be more easily characterized by genotyping (g) methods that also allow classifying individuals into two phenotypes and metabolic groups: carriers of two null *CYP2D6* alleles as gPMs and those with more than two active *CYP2D6* alleles as gUMs. While the genotype classification for gPMs predicts accurately the mPMs because null native levels of activity lead to no metabolic activity, the correlation of genotyping and metabolic phenotypes is not that high for the rest. In fact, only around 40% of mUMs can be predicted by determining the genotype. The lack of relationship between pheno and genotype characterization can be due to the influence of epigenetic or environmental factors, or the existence of unknown or unidentified genetic polymorphisms. Among them, the SNP *CYP2D6* -1584C>G has been related to higher CYP2D6 expression *in vitro* and to higher hydroxylation capacity *in vivo* in patients, as well as linked to *CYP2D6* 31G>A in many mUMs that did not carry *CYP2D6* multiplications. All in all, the study of *CYP2D6* -1584C>G's functional implication could be of relevance to help adjusting the prediction of the metabolic phenotype from genotype.

1.3. In patients under treatment with CYP2D6 substrates, a variation in metabolic phenotype/status may take turn like those that are gUMs and mUMs may become mPM (phenocopy) through inhibition of CYP2D6 activity, which may be caused by the increase of drug dosage or drug-drug interactions, and/or clinical conditions such as disease progression. In these situations instead of abovementioned methods, the therapeutic drug monitoring (TDM) can be used as a measure of CYP2D6 hydroxylation capacity. TDM has been previously used to measure drug interactions in patients with the CYP2D6 substrates amitriptyline, thioridazine or risperidone. Therefore, it could be a valid strategy to determine CYP2D6 metabolic capacity in patients under treatment with CYP2D6 substrates.

2. Interethnic variability. Besides the available abovementioned methods to accurately measure CYP2D6 activity for clinical implementation it is also necessary to identify those populations with a higher frequency of metabolic groups of risk like CYP2D6 UMs. The hypothesis behind is that the frequencies of UMs and allele variants vary across populations with different ethnic background. *CYP2D6*4* has been most described as most frequent in Caucasian populations, *CYP2D6*10* in Asians, *CYP2D6*17* y **29* in Africans, and *CYP2D6*41* and *CYP2D6* multiplications in Middle East populations. In agreement with this, PMs are more frequently found among Caucasians, whereas gUMs are more common in Middle East followed by populations related to the Iberian Peninsula. All in all, it appears relevant to determine whether the frequency of UMs is higher in populations of Latin-America with a Caucasian (Iberian) component.

3. Clinical implication for mental health. Finally, it has been shown that the frequency of *CYP2D6* active gene multiplication is higher in patients with eating disorders (ED) than in healthy volunteers. Moreover, CYP2D6 UMs have been shown to present a higher risk of suicide and worse response to antidepressant treatment.

Therefore, the present Doctoral Thesis was aimed to analyze the relationship between the UM metabolic group and its risk for psychopathology (EDs and Suicide) and response to monotherapy with CYP2D6 antidepressants. Furthermore, it was also aimed to analyze the potential relevance of the prevalence of UMs in groups with different ethnic background. Finally, for the clinical implementation of CYP2D6 UMs detection on the basis of the clinical and epidemiological relevance, it was aimed to analyze the adequacy and availability of methods to characterize UMs. These three aspects were organized in three main sections of studies: Methods for CYP2D6 metabolic characterization (Section 1), CYP2D6 UMs interethnic variability

in Ibero-Americans (Section 2) and clinical relevance of CYP2D6 UMs for mental health (Section 3).

Aims: The present Doctoral Thesis has three general aims. The first of them is to develop methodological proposals for determining CYP2D6 metabolic phenotype in different situations (OG1). It is aimed to develop a phenotyping cocktail that measures the hydroxylation capacity of CYP2D6 and other CYPs (Study I), to improve CYP2D6 genotyping data by studying the relationship between *CYP2D6* -1584C>G polymorphism and CYP2D6 hydroxylation capacity (Study II), and to use the metabolic ratio of a CYP2D6 substrate (aripiprazol) (Study III). Secondly (OG2), it is aimed to evaluate the frequency of UMs in Ibero-American populations like Native Americans from Mexico (Study IV), Spaniards (Study V), Portuguese (Study VI) and a general population of other Ibero-Americans from the CEIBA consortium of the RIBEF network that were clustered by their ethnic origin (Study VII). Finally (OG3), it was aimed to study the clinical implications of CYP2D6 UMs for mental health, specifically in relation to eating disorder symptoms in healthy volunteers (Study VIII), history of suicide attempt in patients with eating disorders (Study IX) and dropout from mono-therapy with CYP2D6 antidepressant substrates in patients with major depression (Study X).

Material and Methods: A total of 5555 individuals are studied, 5229 healthy volunteers and 326 patients, in 12 Ibero-American countries. The proposal of the phenotyping cocktail is developed after careful review of relevant literature on the topic. The determination of *CYP2D6**2, *3, *4, *6, *10, *17, *29, *35 y *41 alleles as well as number of *CYP2D6* active genes is performed throughout PCR-RT with TaqMan® assays. Moreover, *CYP2D6**5 and gene multiplication is evaluated by XL-PCR, whereas the determination of active alleles when *CYP2D6* is multiplied is determined by PCR-RFLP. A HPLC method using ultraviolet detector is used to determine drug plasma concentrations. Self-reported ethnicity is used to assign individuals to each ethnic group. The Eating Disorders Inventory (EDI) scale is used to evaluate symptoms and risk of eating disorders, whereas a diagnostic exam with a structured clinical interview is used to determine eating disorders and history of suicide attempt.

Results: 1. The new phenotyping cocktail proposes using 100 mg of caffeine, 25 mg of losartan, 20 mg de omeprazole y 30 mg of dextromethorphan to measure CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 hydroxylation capacity. Individuals with one or two *CYP2D6* active genes and carrying the *CYP2D6* -1584G variant show a higher debrisoquine metabolic ratio than those that do not carry this allelic variant. Moreover, patients under treatment with aripiprazole in

confluence with any CYP2D6 inhibitors show a higher aripiprazole metabolic ratio than those with two active genes or that not under treatment with other CYP2D6 inhibitors. The measurement of aripiprazol seems to be a good marker of CYP2D6 metabolic capacity.

2. Regarding the interethnic variability of CYP2D6 UMs, the frequency of multiplied *CYP2D6* active genes ranges from 4.3% to 10.7% in eight Amerindian populations from Mexico, is of 3.7% in Spaniards and of 3.0% in Portuguese and of 3.9%, 3.5%, 6.0%, 6.4% and 3.8% in the Ibero-American populations of Amerindians, Caucasians, Africans, Jewish Ashkenazi and Admixed, respectively. The frequency of gUMs is of 5.4% to 20.6% in the eight Amerindian populations studied in México, of 5.3% in Spaniards, of 4.7% in Portuguese, and of 7.3%, 5.4%, 8.4%, 11.6% and 6.6% in the Ibero-American populations of Amerindians, Caucasians, Africans, Jewish Ashkenazi and Admixed, respectively.

3. Regarding the clinical implications of UMs it is found that in a healthy volunteer population of females from Cuba, there is a higher frequency of UMs among those with high scores in the bulimia subscale of the eating disorder inventory (and therefore with risk of developing a disorder of purging bulimia nervosa). Furthermore, *CYP2D6* gUMs are found to be more frequent among individuals with a history of suicide attempt (33.3%) vs. the rest (8.5%) in a subgroup of eating disorder patients with a diagnosis of purging bulimia nervosa. Finally, among patients with a diagnosis of major depression and receiving standard minimum effective doses of fluoxetine or amitriptyline mono-therapy, it is found that all gUMs dropped out treatment during the first four weeks whereas gPM do not discontinue during 12 weeks of follow-up.

Discussion and Conclusions: The results of the present Doctoral Thesis show the clinical implication for mental health of CYP2D6 UMs status as well as its interethnic variability. It also proposes different methodologies for determining UMs with regard to specific situations. The studies of Section 3 show the relationship between CYP2D6 UMs with the risk of purging bulimia nervosa symptoms in a healthy volunteer population of females, with history of suicide attempts specifically among patients with a diagnosis of purging bulimia nervosa and with dropout from antidepressant treatment with CYP2D6 substrates, which is in agreement with previous findings. The studies of Section 2 show that there is wide variability of *CYP2D6* UMs across populations with a different ethnic background, which is also in support of previous results such as those related to a high frequency of gUMs in the Jewish Ashkenazi population. However, present data do not support previous reports suggesting a higher frequency of gUMs in populations of the Iberian Peninsula that also counted as gUMs all those individuals who carried multiplications of

non functional genes. Lastly, different methods to accurately determine CYP2D6 UMs are proposed: a cocktail that give simultaneously a drug test that is CYP2D6 substrate and other (CEIBA) designed for Ibero-American populations, the improvement of the phenotyping-genotyping relationship by analyzing new SNPs or during therapeutic monitoring of aripiprazole that yields results consistent with previous thioridazine or risperidone reports.

In conclusion, the studies of the present Doctoral Thesis show that C1) CYP2D6 hydroxylation capacity is influenced by *CYP2D6* -1584C>G and the intake of CYP2D6 inhibitors, that a cocktail of 4-panel drug test can be very helpful to evaluate the main CYPs simultaneously, and that the use of the metabolic ratio aripiprazole/main metabolite in patients to determine the CYP2D6 metabolic capacity. C2) Secondly, there is variability in the frequency of multiplied CYP2D6 active genes and of gUMs in Ibero-American populations of different ethnic origin, with a higher frequency in a population of Jewish Ashkenazi and some Amerindians; the frequency of UMs is similar in Spain and Portugal, although different to the one published due to different assignment criteria. C3) Finally, CYP2D6 UM is related to the risk of developing purging bulimia nervosa symptoms in healthy volunteer females, to history of suicide attempts in patients with a diagnosis of purging bulimia nervosa and with antidepressant treatment dropout (fluoxetine or amitriptyline) in patients with major depression, which it could partially explain the association of CYP2D6 UMs and suicide.

I. INTRODUCCIÓN

1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA: LA SUPERFAMILIA DE ENZIMAS DEL CITOCROMO P450 (CYP).....	15
2. EL CITOCROMO P450 2D6 (CYP2D6).....	17
2.1. La enzima CYP2D6	17
2.2. Bases moleculares y polimorfismos de <i>CYP2D6</i>	18
3. CAPACIDAD HIDROXILADORA O FENOTIPO METABÓLICO DE CYP2D6.....	20
3.1. Medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 mediante la administración de uno o varios fármacos test.....	21
3.2. Medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 mediante el uso de la monitorización terapéutica de fármacos	25
3.3. Estimación del fenotipo metabólico CYP2D6 a partir del genotipo <i>CYP2D6</i>	27
4. RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD HIDROXILADORA DE CYP2D6 MEDIDA POR ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO TEST Y LA ESTIMADA A PARTIR DEL GENOTIPO <i>CYP2D6</i>	29
4.1. Discordancia entre gUMs y mUMs: estudios de poblaciones.	29
4.2. Discordancia entre gUMs y mUMs: posible asociación del SNP <i>CYP2D6</i> -1584C>G con el metabolismo ultrarrápido CYP2D6.....	31
5. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DE CYP2D6	32
5.1 Variabilidad interétnica de CYP2D6 en poblaciones mundiales.....	32
5.2. Variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas.	34
6. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6.....	37
6.1. Relación entre la variabilidad de la capacidad funcional de CYP2D6 y el metabolismo de fármacos mediado por CYP2D6	37
6.2. CYP2D6 y psicopatología	40

I. Introducción

|

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general el estudio de una de las isoenzimas del sistema del citocromo P450 (CYP) más relevante, CYP2D6, y en el gen que la codifica, *CYP2D6*. Se analizan diversos aspectos en tres partes diferenciadas. En primer lugar, se analiza la capacidad hidroxiladora de CYP2D6, y las diferentes formas de evaluarla en humanos, a partir de la relación entre la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 y las variantes alélicas *CYP2D6*, o mediante el uso de la monitorización terapéutica de fármacos. En segundo lugar, se analiza la variabilidad interétnica de estos fenotipos metabólicos en poblaciones iberoamericanas y, por último, se analizan las implicaciones clínicas del mismo en diferentes situaciones, trastornos del comportamiento alimentarios, suicidio y respuesta a antidepresivos. En resumen, se analizan los distintos fenotipos metabólicos o categorías de la capacidad hidroxiladora del CYP2D6 (especialmente la categoría de metabolizadores ultrarrápidos o UMs) que pueden determinarse por la administración de un fármaco test, a partir de los genotipos de *CYP2D6* o utilizando la medición de niveles plasmáticos en pacientes en tratamiento. En segundo lugar, se evalúa la variabilidad interétnica de los polimorfismos de este citocromo, específicamente los UMs; y, por último, se analizan algunas de las implicaciones clínicas relevantes asociadas (en este caso, trastornos alimentarios y suicidio) y fallo en la respuesta a antidepresivos.

1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA: LA SUPERFAMILIA DE ENZIMAS DEL CITOCROMO P450 (CYP).

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) define la farmacogenética (PGx) como el estudio de las variaciones en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA) relacionadas con la respuesta a los fármacos ¹. Este concepto se englobaría dentro de otro, el de farmacogenómica, que incluiría no solo diferencias en la secuencia del DNA, sino también el estudio de cualquier variación en las características del DNA y el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) ¹. A pesar de la diferenciación de ambos conceptos por parte de la EMA, no hay consenso entre los autores en cuanto a las definiciones de cada término, por lo que se usan frecuentemente como sinónimos.

La variabilidad en la respuesta a fármacos es un fenómeno ampliamente reconocido. La administración de la misma dosis de un fármaco en diferentes individuos conlleva, en la mayoría

I. Introducción

de los casos, la aparición de la respuesta terapéutica deseada. Sin embargo, en algunos sujetos, dicha administración puede dar lugar a la aparición de efectos adversos o a un fallo terapéutico ²⁻⁴. Esta variabilidad en la respuesta a fármacos es de causa multifactorial y poligénica, y está determinada por la interacción genético-ambiental ⁵, describiéndose la influencia no solo de factores genéticos, sino también de otros como la edad, el ciclo menstrual, la etnia, etc. ⁵⁻⁸.

Los polimorfismos en genes que dan lugar a enzimas, transportadores o receptores que intervienen en la respuesta farmacológica son una de las principales causas de la variabilidad interindividual en la respuesta farmacológica ^{7,9,10}. Si las variaciones genéticas afectan a uno o varios de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y/o eliminación, se dice que existe variabilidad a nivel farmacocinético; por el contrario, si afectan al mecanismo de acción de los fármacos se habla de variabilidad a nivel farmacodinámico. Entre los genes más estudiados a nivel farmacocinético en PGx destacan aquellos que codifican para enzimas de la superfamilia de citocromos P450 (CYP).

La superfamilia CYP engloba a un conjunto de hemoproteínas que participan en gran parte del metabolismo en Fase I de xenobióticos. En esta fase del metabolismo los sustratos son transformados a través de reacciones de oxidación y reducción con el objetivo de aumentar la polaridad de la molécula y generar productos más hidrosolubles que puedan ser fácilmente excretados. Como consecuencia de esta transformación se puede provocar la inactivación del fármaco, la conversión de una molécula inactiva en otra activa (la molécula inactiva se denominaría profármaco) o bien podría suceder que ambas moléculas sean activas. Este paso es previo a la Fase II o de conjugación, donde las moléculas, procedentes de la Fase I en su mayoría, se unen a una sustancia endógena como el ácido glucurónico, lo que conlleva el aumento del tamaño de la molécula y, en la mayoría de los casos, una inactivación del fármaco o del metabolito activo ¹¹. Al margen de su participación en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos, las CYP están implicadas en el metabolismo de sustancias endógenas ¹².

Las isoenzimas de la superfamilia CYP se clasifican en *familias*, que agrupan a aquellas enzimas con una homología de secuencia superior al 40% y que se designan por un número arábigo (p.ej., CYP2). Estas *familias* pueden dividirse a su vez en *subfamilias* si la similitud entre las secuencias es mayor al 55% (en este caso se designan por una letra, p. ej. CYP2D). Cada miembro de las diferentes subfamilias es identificado a su vez por otro número arábigo (p. ej.

CYP2D6)¹³. En humanos se han descrito varias familias, si bien parece que solo 3 (CYP1, CYP2 y CYP3) contribuyen al metabolismo de fármacos y xenobióticos¹⁴⁻¹⁶. De estas enzimas, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 metabolizan más del 90% de los fármacos más utilizados actualmente en la clínica^{17,18}.

2. EL CITOCROMO P450 2D6 (CYP2D6)

2.1. La enzima CYP2D6

La enzima CYP2D6 está formada por 497 aminoácidos y, al igual que la mayoría de las enzimas CYP, CYP2D6 se encuentra localizada en el retículo endoplasmático celular. Aquí interactúa con la enzima NADH-P450 reductasa, de la cual recibe electrones para oxidar diferentes sustratos¹¹. La isoenzima CYP2D6 se expresa no solo en el hígado, donde supone aproximadamente el 2% del contenido total de los CYPs, sino en otros órganos como el cerebro^{12,19,20}.

CYP2D6 participa en el metabolismo del 20-25 % de los fármacos utilizados en la clínica, como bloqueantes (metoprolol, propanolol, etc.), antidepresivos (fluoxetina, imipramina, etc.), antipsicóticos (aripiprazol, haloperidol, etc.), antineoplásicos (tamoxifeno) y opioides (codeína)^{7-9,21}. Además, esta enzima está implicada en el metabolismo de sustancias endógenas, por ejemplo, en la regeneración de serotonina desde 5-metoxitriptamina²². De este modo, CYP2D6 podría intervenir en la modulación del sistema serotoninérgico y por tanto relacionarse con aspectos del funcionamiento psicológico y psicopatología, lo que conllevaría la posibilidad de estar implicada en la enfermedad mental^{23,24}. La implicación de CYP2D6 en el metabolismo de productos endógenos será desarrollada más adelante, en un apartado posterior (“6.2. *Metabolismo endógeno de CYP2D6: relación de la actividad CYP2D6 con rasgos de personalidad, vulnerabilidad a psicopatología, trastornos del comportamiento alimentario y suicidio*”) de esta introducción

En cuanto a la capacidad catalítica de CYP2D6, han sido descritos dos grupos de individuos con diferente capacidad, los metabolizadores lentos (PMs, del inglés “poor metabolizers”) y los metabolizadores rápidos (EMs, del inglés “extensive metabolizers”). El grupo de PMs engloba a aquellos individuos incapaces de metabolizar los sustratos de CYP2D6; el grupo de EMs, por su

parte, incluye a los sujetos con actividad enzimática de CYP2D6 “normal”. Este grupo se ha categorizado en otros más, los metabolizadores ultrarrápidos (UMs, del inglés “ultrarapid metabolizers”) y los intermedios (IMs, del inglés “intermediate metabolizers”), con una capacidad hidroxiladora de CYP2D6 incrementada y disminuida respecto de los EMs, respectivamente ^{21,25}.

2.2. Bases moleculares y polimorfismos de CYP2D6

El gen que codifica para la enzima CYP2D6 (*CYP2D6*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 22, concretamente en la posición 22q13.1 ²⁶. Consta de 4383 pares de bases, que se agrupan en 8 intrones y 9 exones. Este locus contiene además dos pseudogenes próximos, *CYP2D7* y *CYP2D8*, que se encuentran en una región situada a 45 Kb ^{27,28}.

CYP2D6 es extremadamente polimórfico, no obstante más de 100 variantes alélicas han sido descritas hasta la fecha ²⁹. Estas variantes alélicas se originan como consecuencia de diversos tipos de polimorfismos: polimorfismos de base única (SNPs) en la región codificante, promotora o intrónica del gen (que da lugar p.ej. a *CYP2D6*2*, **4* o **17*), inserciones o deleciones de una o más bases nitrogenadas (como ocurre en *CYP2D6*3*, **6* o **9*, entre otros alelos), inserciones del pseudogén *CYP2D7* (nombrados como *CYP2D6*13*) o la deleción completa del gen (que origina el *CYP2D6*5*). Además se han descrito multiplicaciones del gen de alelos funcionales (*CYP2D6*1xN* o **2xN*) y no funcionales (*CYP2D6*4xN*).

Los diferentes alelos del gen codifican para proteínas que pueden tener actividad reducida, normal, incrementada o ausente (Tabla I). Entre las variantes alélicas de *CYP2D6* que se han relacionado con ausencia de actividad enzimática se encuentran *CYP2D6*3*, **4*, **5* y **6*. Otras variantes como *CYP2D6*10*, **17*, **29* o **41* se han asociado con una función proteica reducida, mientras que alelos como *CYP2D6*1xN* y **2xN* están asociados con una actividad enzimática de *CYP2D6* incrementada ³⁰ (Tabla I).

La frecuencia de los alelos de *CYP2D6* varía entre distintos grupos étnicos, como se expone en las publicaciones A7.1 y A7.2. Por ejemplo, los alelos no funcionales más frecuentes en caucásicos son *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5* y *CYP2D6*3*; *CYP2D6*10* es más frecuente en poblaciones del Este de Asia y *CYP2D6*17* lo es en poblaciones negras africanas. Por su parte, la multiplicación de genes activos *CYP2D6* se observa más frecuentemente en la zona de Oriente Medio y los países circundantes, como Etiopía. En el apartado “5. Variabilidad interétnica

de *CYP2D6*” de la introducción se desarrollará con mayor detalle la información sobre la variabilidad poblacional de *CYP2D6*.

Los polimorfismos del gen *CYP2D6* (Tabla I) contribuyen, al menos en parte, a la variación interindividual en el metabolismo de fármacos sustratos de *CYP2D6* ^{8,31}. Así, algunos genotipos de *CYP2D6* se han asociado con fallo en la respuesta al tratamiento y con la aparición o el incremento de efectos adversos cuando los pacientes son tratados con fármacos metabolizados por esta enzima ^{2,4,32-35}. La importancia clínica del polimorfismo de *CYP2D6*, principalmente del metabolismo incrementado de *CYP2D6* se desarrollará en el apartado “6. Implicaciones clínicas del metabolismo ultrarrápido *CYP2D6*” de la introducción.

Tabla I. Descripción de polimorfismos del *CYP2D6* más estudiados (adaptado de la base de la base de datos del Comité para la Nomenclatura de alelos de las enzimas CYP ²⁹)

Alelo <i>CYP2D6</i>	Polimorfismo	Efecto	Actividad enzimática
*2A	-1584C>G	-	Normal ^A
*3	2549delA	Desplazamiento del marco de lectura en el aminoácido 259	Ninguna
*4	100C>T; 1846G>A	P34S; Defecto en el proceso de corte y empalme de mRNA	Ninguna
*5	Delección del gen <i>CYP2D6</i>	No se produce proteína	Ninguna
*6	1707delT	Desplazamiento del marco de lectura en el aminoácido 118	Ninguna
*10	100C>T	P34S	Disminuida
*17	1023C>T	T1071	Disminuida
*29	3183G>A	V338M	Disminuida
*35	-1584C>G; 31G>A	- V11M	Normal ^A
*41	2988G>A	Defecto en el proceso de corte y empalme de mRNA	Disminuida
*1xN o *2xN	Multiplicación de <i>CYP2D6</i>	Más de dos copias de <i>CYP2D6</i>	Aumentada

^AEl polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G, presente en el alelo *CYP2D6**2A y *35 entre otros, podría estar asociado a una capacidad hidroxiladora incrementada de *CYP2D6*, al asociarse *in vitro* a una mayor expresión de la enzima *CYP2D6* ³⁶. Una revisión de la literatura al respecto puede encontrarse en el apartado de la introducción “4.2. Discordancia entre gUMs y mUMs: posible asociación del SNP *CYP2D6* -1584C>G con el metabolismo ultrarrápido *CYP2D6*”. La actividad en este

caso se apunta como normal porque así aparece en la página oficial del Comité para la Nomenclatura de Alelos del Citocromo P450 (CYP) Humano (www.cypalleles.ki.se).

3. CAPACIDAD HIDROXILADORA O FENOTIPO METABÓLICO DE CYP2D6

Como ya se comentó anteriormente, la variabilidad en la respuesta farmacológica está determinada, entre otros factores, por la interacción entre genes implicados en el metabolismo y factores ambientales⁵. Dicha interacción genera una expresión enzimática individual, el denominado “fenotipo metabólico”, que representa la capacidad metabólica de una enzima, y en el caso particular de CYP2D6, su capacidad hidroxiladora.

Los estudios en este área comenzaron a finales de los años 70 del siglo pasado, cuando un grupo de investigadores británicos midieron la concentración del fármaco debrisoquina (DBQ) y de su metabolito 4-hidroxidebrisoquina (4-OHDBQ) en la orina de 94 voluntarios sanos tras la administración de una única dosis oral de 10 mg de DBQ³⁷. En este estudio se observó que el índice entre la DBQ y su metabolito excretados en orina se distribuía bimodalmente en la población, identificándose un grupo de individuos con incapacidad metabólica, los PMs. Además, un estudio posterior del mismo grupo demostró que esta incapacidad para metabolizar DBQ (fenotipo metabólico PM) tenía un origen monogénico, debiéndose a la herencia de un rasgo autosómico recesivo³⁸. Casi a la vez e independientemente, un grupo de investigadores alemanes observó un comportamiento similar en una población de sujetos tras la toma de esparteína³⁹. Con el tiempo se demostró que ambos rasgos estaban relacionados⁴⁰ y que el gen causante de este defecto era el *CYP2D6*^{27,41,42}.

A partir de entonces, se iniciaron una serie de trabajos con el fin de analizar la farmacogenética de diversos fármacos en diferentes poblaciones y de identificar la enzima responsable de otros polimorfismos del metabolismo de otros fármacos. Por ejemplo, además del polimorfismo metabólico de DBQ y esparteína, se describió el polimorfismo metabólico de mefenitoína⁴³ y se identificó la enzima CYP2C19 como la responsable de dicho polimorfismo⁴⁴. Todos estos estudios sentaron las bases para los estudios actuales del fenotipo metabólico de las enzimas CYP.

La capacidad hidroxiladora de la enzima CYP2D6 puede ser evaluada mediante el cálculo del fenotipo metabólico después de la medida de las concentraciones de un fármaco test y su metabolito en plasma u orina²¹. Esta aproximación permite identificar los grupos metabolizador

lento o mPM y metabolizador rápido o mEM. Además, el análisis del genotipo *CYP2D6* individual, basado en las características funcionales de cada alelo de *CYP2D6*, también permite predecir o estimar la capacidad hidroxiladora de la enzima *CYP2D6*; en este caso se identifican los grupos metabolizador lento estimado a partir del genotipo *CYP2D6* o gPM, metabolizador rápido o gEM, y metabolizador ultrarrápido o gUM^{25,30,45}. En el primer caso, se necesita la ausencia de tratamiento farmacológico, lo que limita esta metodología a voluntarios sanos. Por tanto, se ha postulado que la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* podría ser evaluada en pacientes tratados con fármacos sustratos de *CYP2D6* a partir de la medida de los niveles plasmáticos del fármaco administrado con fines terapéuticos y su metabolito⁴⁶⁻⁴⁸. En los apartados siguientes se revisan estas metodologías.

3.1. Medida de la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* mediante la administración de uno o varios fármacos test

3.1.1 Cálculo del índice metabólico

La administración de una dosis única de un fármaco (fármaco test) a un grupo de individuos es el recurso más ampliamente utilizado para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP. Sin embargo, el uso de esta metodología está limitado prácticamente a voluntarios sanos al requerir la ausencia de tratamiento. De lo contrario, el resultado obtenido sería una fenocopia generada por la interacción con el tratamiento farmacológico.

Para llevar a cabo este tipo de estudios, una vez administrado el fármaco test y esperado un tiempo adecuado, se recoge un fluido biológico (principalmente orina, plasma o saliva) que se utilizará para medir las concentraciones del fármaco y del metabolito que genera la enzima que se quiere estudiar. A partir de las concentraciones se genera una medida de la capacidad metabólica de la enzima, el índice metabólico (MR, del inglés “metabolic ratio”), definido como:

$$\text{MR} = \% \text{ de la dosis excretada como fármaco} / \% \text{ de la dosis excretada como metabolito}$$

Este MR se puede representar en una gráfica frente al número de individuos (histograma de distribución de frecuencias; Figura 1), y permite evaluar la capacidad metabólica de la enzima cuando esta no se encuentra saturada, a partir del cálculo de la antimoda.

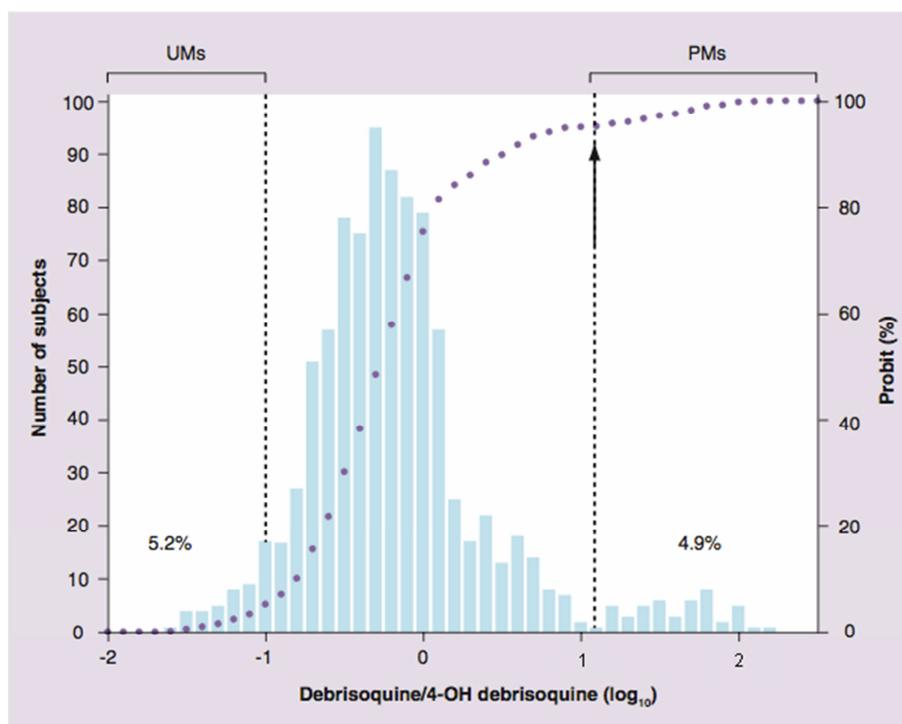


Figura 1. Distribución bimodal del índice metabólico de debrisoquina/4hidroxidebrisoquina (\log_{10}) en una población de 925 voluntarios sanos españoles ⁴⁹. La flecha ascendente muestra la antímoda que separa los mPMs de los mEMs en esta población. Las líneas punteadas verticales estima la separación entre mPMs y los mUMs. Tomada de LLerena y cols ²¹.

Para la medida de la capacidad hidroxiladora de una enzima, no todos los fármacos pueden ser utilizados con la misma validez ⁵⁰. Un fármaco es idóneo como fármaco test cuando ^{50,51}:

- a) Es ampliamente metabolizado por la enzima en evaluación
- b) Es seguro cuando se administra a dosis única, es decir, tiene un amplio rango terapéutico y/o un bajo perfil de efectos adversos.
- c) Es de fácil manejo y administración.
- d) Es de fácil acceso en diferentes países, de manera que los estudios puedan ser replicados en distintas poblaciones.
- e) Existe una metodología analítica o es posible desarrollar un método para la determinación sensible, exacta y reproducible de las concentraciones del fármaco y su metabolito en un fluido biológico previamente seleccionado.

Para medir la capacidad hidroxiladora de la enzima CYP2D6 los fármacos más utilizados

históricamente son la DBQ, el dextrometorfano (DXT) y la esparteína (SPT) (Tabla II). Actualmente el fármaco test de elección es el DXT, debido a su extensa distribución en diferentes países, su amplio rango terapéutico, la disponibilidad de métodos analíticos, y a su buena capacidad para discriminar la capacidad hidroxiladora entre individuos ⁵¹.

Tabla II. Fármacos test y metabolitos más utilizados para evaluar la capacidad hidroxiladora de la enzima CYP2D6.

FÁRMACO TEST	METABOLITO	FLUIDO BIOLÓGICO	ANTIMODA (MR)	ANTIMODA (Log ₁₀ MR)	REFERENCIA
Debrisoquina	4-hidroidebrisoquina	Orina 8h	12.6	1.1	37,38
Esparteína	2,3-dihidroesparteína + 4,5 dihidroesparteína	Orina 12h	20	1.3	39,52
Metoprolol	α-hidroximetoprolol	Orina 8h	12.6	1.1	53,54
Dextrometorfano	Dextrorfan	Orina 8h	0.3	-0.523	55,56

MR = índice metabólico. Log₁₀ MR = logaritmo en base 10 del índice metabólico

La distribución que se obtiene en la representación de MR frente al número de individuos cuando se estudia la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 suele ser bimodal y permite separar mediante una antimoda o punto de corte a los individuos mPMs de los mEMs (Figura 1). El valor de la antimoda puede ser estimado ^{57,58}, y es característico de cada uno de los fármacos test en las diferentes poblaciones (Tabla II). El grupo de mPMs incluye a aquellos individuos incapaces de metabolizar el fármaco. En estos sujetos se produce una acumulación del fármaco no metabolizado, mientras que las concentraciones del metabolito son muy bajas, y en muchos casos, casi inexistentes. Es por ello que el MR alcanza en estos individuos valores muy altos y se sitúan a la derecha de la antimoda (Figura 1). El resto de individuos, los denominados mEMs, presentan un amplio rango de MRs y se sitúan a la izquierda de la antimoda (Figura 1).

Además, en determinadas poblaciones, se ha descrito un grupo de metabolizadores ultrarrápidos (mUMs) en el extremo de los mEMs, caracterizados por una capacidad hidroxiladora de la enzima CYP2D6 incrementada ^{21,25,30}. Sin embargo, este grupo metabólico no se encuentra

separado por una antimoda de los mEMs, lo que dificulta la definición clara de los mismos. Probablemente, además del genotipo *CYP2D6*, muchos factores estén influyendo en esta capacidad hidroxiladora incrementada o disminuida de la enzima *CYP2D6*.

Algunos estudios de fenotipo metabólico con diferentes fármacos test han asignado un valor arbitrario de MR para separar a los individuos mUMs de los mEMs (MR de DBQ menor o igual a 0.2⁵⁹ o a 0.1³⁰, MR de SPT menor o igual a 0.2⁶⁰ o MR de DXT menor o igual a 0.0003⁶¹), aunque no se ha llegado aún a un consenso sobre el problema de la no existencia de una antimoda para separar mUMs de mEMs. Por todo ello, existe la necesidad de una estandarización del punto de corte con diferentes fármacos test, como se discute en la publicación A7.2. Sin embargo, pocos estudios de fenotipo metabólico de *CYP2D6* separan el grupo de metabolizadores intermedios o mIMs, y hasta la fecha no se ha propuesto un punto de corte para separar a estos individuos del resto de mEMs. Por ello, durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se considerarán los grupos mPMs, mEMs y, entre ellos, los mUMs, agrupando a los mIMs dentro de los mEMs.

3.1.2. Desarrollo de “cócteles de fenotipación”

Si bien la administración de un único fármaco test permite la medida del fenotipo metabólico de una enzima, actualmente los estudios se han dirigido a la fenotipación metabólica de varias enzimas mediante la administración de los llamados “cócteles de fenotipación”. Dichos cócteles consisten en una selección de diferentes fármacos test (cada uno específico para una enzima CYP, a lo sumo para dos) que se administran conjuntamente en una única toma, o bien en tomas separadas por muy poco espacio de tiempo.

Los estudios de determinación del fenotipo metabólico de las enzimas CYP usando cócteles de fenotipación poseen varias ventajas cuando se comparan con métodos de fenotipo selectivos⁶² en los que se administra un único fármaco test en cada estudio. Por un lado, permiten obtener información de la actividad metabólica de varias enzimas en un solo estudio^{62,63}. Además, este tipo de estudios supone menor tiempo de análisis y el uso de una cantidad de muestra más pequeña^{62,63}, pues con un único análisis se podrían detectar los fármacos test y los metabolitos. Por otro lado, este tipo de estudios permite que en una solo toma de muestra se obtenga todo el

material que se necesita para la medida de la capacidad hidroxiladora de varios CYP, evitando así molestias innecesarias a los voluntarios que participan en este tipo de estudios.

Sin embargo, estos estudios no están exentos de problemas. La principal desventaja, en comparación con los estudios de fenotipo metabólico selectivo, es la posible interacción fármaco-fármaco que puede surgir entre los fármacos test utilizados. Es por ello que deben diseñarse cócteles de fenotipación, eligiendo fármacos test que no interaccionen entre ellos y que no inhiban o induzcan algunas de las enzimas CYP que se quieren analizar. En la actualidad, varios estudios han demostrado la fiabilidad y utilidad del uso de cócteles de fenotipación in vivo ⁶⁴⁻⁶⁸.

3.2. Medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 mediante el uso de la monitorización terapéutica de fármacos

Como ya se expuso anteriormente, la administración de un fármaco test permite medir la capacidad metabólica de CYP2D6. Este tipo de estudios se realizan principalmente en voluntarios sanos sin tratamiento farmacológico, y en los que incluso se puede controlar, si es necesario, la ingesta de alimentos. Sin embargo, su uso en pacientes durante el tratamiento es cuestionable, puesto que la administración de un fármaco test podría interaccionar con fármacos administrados con fines terapéuticos.

Por ello, se ha propuesto el uso de la monitorización terapéutica de fármacos (TDM, del inglés “therapeutic drug monitoring”) como una medida de la capacidad hidroxiladora de la enzima CYP2D6 ^{47,48} en pacientes tratados con fármacos sustratos de esta enzima. Además, también se ha planteado el uso de la TDM para identificar interacciones fármaco-fármaco ^{46,48,69}, lo cual permitiría utilizar la TDM como una medida para el seguimiento de un determinado paciente, facilitando la identificación de interacciones entre fármacos en pacientes tratados con politerapia, situación más común en la práctica clínica.

3.2.1. Monitorización terapéutica de tioridazina

El uso de la TDM como medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 fue propuesto inicialmente en un estudio con 28 pacientes en tratamiento en monoterapia con tioridazina ⁴⁷. En este trabajo los pacientes fueron fenotipados con DBQ, lo que permitió describir la correlación entre el MR de tioridazina/mesoridazina y el MR de DBQ/4-OHDBQ ⁴⁷. Además, y en relación al uso de tioridazina como una medida de la actividad hidroxiladora de CYP2D6, un estudio

I. Introducción

posterior ⁷⁰ en 16 pacientes tratados también en monoterapia con tioridazina y genotipados para los alelos sin actividad *CYP2D6**3, *4, *5 y *6, mostró la correlación del MR DBQ/4-OHDBQ con la dosis y el nivel plasmático de tioridazina ⁷⁰.

Asimismo, en este estudio se evaluó la capacidad inhibidora de la enzima durante el tratamiento y la variabilidad que puede depender de la dotación genética de cada individuo ⁷⁰, y se comprobó que la retirada del tratamiento con tioridazina en 10 pacientes hizo que 8 de estos pasaran de ser identificados como mPMs *CYP2D6* (MR DBQ/4-OHDBQ \geq 12.6) cuando estaban en tratamiento con tioridazina, a ser agrupados como mEMs *CYP2D6* tras retirarse este fármaco ⁷⁰. Los 2 pacientes que mantuvieron el fenotipo metabólico mPM *CYP2D6* tras dejar el tratamiento con tioridazina fueron identificados con el genotipo *CYP2D6**4/*4 ⁷⁰ (gPM). Estos resultados demostraron la fenoverción durante el tratamiento, y por tanto la importancia relativa de la genotipación durante el tratamiento.

Por último, el mismo trabajo mostró que el genotipo *CYP2D6* del paciente, junto a la dosis de tioridazina que recibía, influía en el MR DBQ/4-OHDBQ y, por tanto, en la asignación a un grupo metabólico u otro (mPM o mEM), cuando los pacientes en tratamiento con tioridazina fueron fenotipados con DBQ ⁷⁰. En otras palabras, la fenoverción es dependiente del genotipo y la dosis del fármaco administrado.

Como se ha expuesto en el párrafo anterior, los pacientes con genotipo *CYP2D6* *wt/wt* y que no tomaban tioridazina fueron 100% mEMs cuando se fenotiparon con DBQ. Sin embargo, la toma de 50 y 100 mg de tioridazina hizo que solo el 33 y el 29% de los individuos, respectivamente, fueran considerados mEMs tras la fenotipación con DBQ, mientras que la toma de al menos 150 mg de tioridazina hizo que todos los individuos *CYP2D6* *wt/wt* tuvieran un MR DBQ/4-OHDBQ \geq 12.6, y por tanto fueran clasificados como mPMs ⁷⁰. Por el contrario, en los individuos cuyo genotipo fue *CYP2D6* *wt/*4* la toma de 50 mg de tioridazina provocó que todos los pacientes fueran identificados como mPMs tras la fenotipación con DBQ ⁷⁰. Estos resultados demostraron que 150mg parece la dosis a partir de la cual todos los pacientes en tratamiento con tioridacina se transforman en mPM independientemente del genotipo *CYP2D6*.

3.2.2. Monitorización terapéutica de risperidona

La posible utilización de la monitorización terapéutica de risperidona, otro fármaco sustrato de CYP2D6, como una medida para estimar la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 se describió posteriormente ⁴⁸, al mostrarse la correlación entre MR DBQ/4-OHDBQ y el MR risperidona/9-hidroxisperidona ⁴⁸. Además, este estudio mostró que el MR DBQ/4-OHDBQ, la concentración plasmática de risperidona corregida por dosis y el MR risperidona/9-hidroxisperidona fueron significativamente mayores en pacientes en tratamiento con risperidona y politerapia con fuertes inhibidores CYP2D6, que en pacientes en monoterapia con risperidona ⁴⁸. Este resultado pone de manifiesto que el uso concomitante de inhibidores de CYP2D6 junto al tratamiento con risperidona supone una interacción farmacológica ⁴⁸, la cual eleva las concentraciones de risperidona y podría suponer un aumento de los efectos adversos de este fármaco. Apoyando este resultado, se han descrito síntomas piramidales severos y un MR risperidona/9-hidroxisperidona muy alto en un individuo con genotipo *CYP2D6 wt/*4* en tratamiento con risperidona que además estaba simultáneamente recibiendo haloperidol y levomepromazina ⁶⁹, conocidos por ser sustrato e inhibidor, respectivamente, de la enzima CYP2D6.

Los datos anteriormente expuestos, junto a otros resultados similares obtenidos por la monitorización de nortriptilina ⁴⁶, parecen mostrar que el uso de la TDM podría ser un buen indicador, por un lado, de la capacidad metabólica de CYP2D6 cuando se monitorizan los niveles plasmáticos de fármacos sustratos de esta enzima, y, por otro lado, de las posibles interacciones entre fármacos que pueden sufrir los pacientes en politerapia.

3.3. Estimación del fenotipo metabólico CYP2D6 a partir del genotipo CYP2D6

Si bien la administración de un fármaco test es el método ideal para la determinación de la capacidad metabólica *in vivo* de una enzima en voluntarios sanos (o al menos, en individuos sin tratamiento farmacológico que pueda interactuar con el fármaco test), la accesibilidad y el abaratamiento de los métodos de genotipación ha provocado que esta metodología esté siendo ampliamente utilizada como medida indirecta de la valoración funcional de varias enzimas, entre ellas CYP2D6 ^{25,30,71}. Así, se ha empezado a utilizar el “fenotipo extrapolado del genotipo” (FEG) como una estimación de la capacidad metabólica de CYP2D6 y otras enzimas.

I. Introducción

Desde que se estandarizó en 2008 ²⁵, varios estudios han utilizado, con ligeras modificaciones, esta metodología de FEG ^{30,71,72}, hasta convertirse hoy día en la herramienta más utilizada cuando se quiere estudiar la capacidad hidroxiladora de una enzima CYP. Todo ello a pesar de que este método *estima* pero no *mide* de manera real el fenotipo metabólico de una enzima CYP, con las limitaciones que esto supone, como se explicará en los siguientes apartados.

La utilización de los FEGs se basa en la asignación de un valor numérico a cada alelo *CYP2D6* en función de la actividad metabólica de la proteína que codifican, de manera que al final se obtiene un valor numérico por cada genotipo *CYP2D6*. Así, los alelos que codifican para proteínas sin actividad reciben el valor de 0; los alelos que dan lugar a proteínas con actividad reducida son valorados como 0.5; aquellos alelos que codifican para una enzima con actividad normal reciben el valor de 1; y por último, la duplicación/multiplicación de alelos activos son valorados con una puntuación de 2 o más, dependiendo del número de multiplicaciones del alelo.

Así, cuando un individuo tiene un valor asignado al genotipo *CYP2D6* de 0, es decir, porta dos alelos sin actividad, recibe el nombre de metabolizador lento a partir de la estimación de los datos del genotipo *CYP2D6* o gPM ^{25,30}. Por el contrario, si el valor que recibe es mayor a 2, y por tanto posee más de dos copias de alelos funcionales, recibe el nombre de metabolizador ultrarrápido a partir de la estimación de los datos del genotipo *CYP2D6* o gUM ^{25,30}. El resto de individuos suelen agruparse dentro de los gEMs, aunque algunos trabajos describen un grupo adicional de metabolizadores intermedios o gIMs ⁴⁵. No obstante, la clasificación de este grupo genera controversia, puesto que algunos autores consideran gIMs los individuos con un valor asignado al genotipo *CYP2D6* de 0.5 ²⁵, mientras que otros consideran gIMs a aquellos con valores 0.5 y 1 ⁴⁵. Para los estudios de la presente Tesis Doctoral, se considerarán únicamente los grupos de gPMs, gEMs y gUMs, incluyéndose los gIMs dentro del grupo de gEMs.

Es importante en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral destacar la diferencia entre gPM-gEM-gUM y mPM-mEM-mUM. En el primer caso se hace referencia a la estimación del fenotipo metabólico a partir de los datos de genotipo *CYP2D6*; en el segundo caso, la medida del fenotipo metabólico *CYP2D6* se obtiene a partir de la medida del MR alcanzada en las concentraciones plasmáticas o urinarias de un fármaco test o de otro administrado en el contexto del tratamiento.

4. RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD HIDROXILADORA DE CYP2D6 MEDIDA POR ADMINISTRACIÓN DE UN FÁRMACO TEST Y LA ESTIMADA A PARTIR DEL GENOTIPO CYP2D6

El genotipo para los alelos *CYP2D6* más frecuentes en diferentes poblaciones puede predecir la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* con una cierta exactitud ⁷³⁻⁷⁶.

En una población determinada, el cálculo de gPMs, es decir, de aquellos portadores de dos alelos sin actividad, permite identificar a los individuos mPMs con una certeza de alrededor del 95% ^{30,60,76-78}. Por el contrario, la presencia de genes activos *CYP2D6* multiplicados solo explica una fracción reducida (10-40%) de los individuos clasificados como mUMs ^{30,59,77}. Así, aunque el mUM de *CYP2D6* se ha asociado a la herencia de genes activos *CYP2D6* duplicados o amplificados ^{59,79}, las bases genéticas y/o bioquímicas de la alta capacidad hidroxiladora en individuos sin multiplicación de alelos aún no ha sido explicadas.

4.1. Discordancia entre gUMs y mUMs: estudios de poblaciones.

Desde que se asoció el mUM de *CYP2D6* con la duplicación o multiplicación de genes activos *CYP2D6* en dos familias ⁷⁹, pocos estudios han analizado claramente la relación entre los fenotipos gUM y mUM de *CYP2D6*.

El primer estudio de poblaciones que se llevó a cabo para analizar la relación entre una alta capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* y el número de genes activos *CYP2D6* se realizó en 1995 en una población sueca ⁵⁹. Los resultados de este trabajo mostraron que algo más del 20% de los individuos con un fenotipo metabólico muy rápido (clasificados en este trabajo como aquellos con un MR de DBQ menor o igual a 0.2) fueron portadores de multiplicaciones en el gen *CYP2D6*, y este valor alcanzaba el 40% si se incluían los individuos con MR menor o igual a 0.1 ⁵⁹. Entre los individuos cuyo MR fue mayor a 0.2, solamente un sujeto era portador de la duplicación del gen *CYP2D6* ⁵⁹. Posteriormente, en un estudio llevado a cabo en una población etíope ⁸⁰, los sujetos con multiplicaciones del alelo *CYP2D6**2 tuvieron, en general, un MR de DBQ menor a 0.4, llegando a valores de 0.07 y 0.05 en dos casos. Sin embargo, hubo dos individuos portadores de multiplicaciones en dicho alelo con valores de MR mayores a 0.4 ⁸⁰.

Más tarde, en una población alemana fenotipada con DBQ y DXT ⁷⁷, se encontró que los portadores de dos y tres genes activos *CYP2D6* difirieron significativamente en su capacidad de

I. Introducción

metabolizar DBQ. Sin embargo, y aunque no se discute en este trabajo, el análisis de los resultados presentados permite observar que varios individuos con dos genes *CYP2D6* activos tienen MRs de DBQ y DXT similares a los individuos portadores de tres genes *CYP2D6* activos⁷⁷. En otra población alemana estudiada con SPT⁶⁰, que clasificó a los individuos con MR menor o igual a 0.2 como mUMs *CYP2D6*, se encontró que, aunque el 100% de los individuos portadores de más de dos genes activos *CYP2D6* se situaban en el grupo mUM, solo el 11.1% de los sujetos clasificados como mUMs portaban este genotipo⁷⁷. Dicho de otra manera, casi el 90% de los individuos clasificados como mUMs *CYP2D6* no fueron portadores de más de dos genes activos *CYP2D6*, es decir, no fueron gUMs *CYP2D6*.

Otros trabajos han estudiado la relación fenotipo metabólico *CYP2D6* – genotipo *CYP2D6* en diferentes poblaciones, pero sin profundizar en la relación gUM – mUM^{75,78,81–84}, posiblemente porque no existe un consenso en la determinación del fenotipo metabólico mUM *CYP2D6* en la literatura, como ya se discutió anteriormente en la introducción y puede profundizarse en la publicación A7.2. El análisis de los datos de estos estudios parece mostrar de nuevo discordancias en la relación gUM – mUM. Por ejemplo, en una población de Ghana fenotipada con SPT⁸² se puede observar que ninguno de los individuos gUMs de *CYP2D6* (con más de tres genes activos *CYP2D6*) se clasifican en el grupo de mUMs *CYP2D6* (que en este estudio incluye a los sujetos con un MR menor a 0.2), sino que los únicos individuos mUMs tienen genotipos *CYP2D6**1/*1 y *CYP2D6**2*2.

Los últimos trabajos que analizan la relación mUM – gUM *CYP2D6* se realizaron en poblaciones Latinoamericanas^{30,61}. El primer estudio se llevó a cabo en una población de origen europeo de Cuba, y en poblaciones mestizas de Cuba y Nicaragua, que fueron fenotipadas con DBQ³⁰. Se observó que entre los mUMs (clasificados en este estudio como aquellos con MR menor o igual a 0.1) solo el 40% fueron gUMs, mientras que solo el 23.5% de los individuos gUMs fueron además mUMs³⁰. El segundo estudio analiza el fenotipo metabólico de *CYP2D6* con DXT en dos poblaciones de Trinidad y Tobago, una de ascendencia india y la otra de ascendencia africana⁶¹. En este caso, cuatro individuos se clasificaron como mUMs (MR menor a 0.0003) y 13 como gUMs. De ellos, solo un sujeto fue gUM y, además, mUM⁶¹.

Puestos en conjunto, los datos de estos estudios parecen mostrar que, a pesar de la asociación entre mUM y la presencia de más de dos copias activas del gen *CYP2D6* en un individuo, solo

alrededor del 40% de individuos gUMs corresponden finalmente al grupo mUM CYP2D6. Posiblemente, otros factores, genéticos o no, podrían estar influyendo en dicha relación, como la presencia de polimorfismos desconocidos o de factores epigenéticos no estudiados. Así, individuos sin multiplicación de *CYP2D6* pueden mostrarse como mUMs, y al contrario, individuos con más de dos copias activas de *CYP2D6* finalmente podrían no clasificarse como mUM en estudios de análisis del fenotipo metabólico.

4.2. Discordancia entre gUMs y mUMs: posible asociación del SNP *CYP2D6* -1584C>G con el metabolismo ultrarrápido *CYP2D6*.

El SNP -1584C>G (rs1080985) del gen *CYP2D6* podría estar asociado con el metabolismo ultrarrápido, puesto que se ha identificado como un factor influyente en la expresión de la enzima *CYP2D6* ³⁶. El tipo mutante -1584G se ha asociado con una mayor expresión de *CYP2D6* que el tipo -1584C ³⁶. Este polimorfismo se asoció por primera vez con el alelo *CYP2D6**2, y el Comité para la Nomenclatura de Alelos del Citocromo P450 (CYP) Humano asignó el *2[-1584G] como *CYP2D6**2A y el alelo *2[-1584C] como *CYP2D6**41 ²⁹. Con el tiempo se comprobó que la variación *CYP2D6* -1584C>G aparecía, además, ligada al polimorfismo 31G>A en el alelo funcional *CYP2D6**35 ⁸⁵.

Varios estudios han analizado este polimorfismo y su relación con la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6*, con resultados contradictorios ^{75,86-89}. Dos estudios en poblaciones mestiza y amerindia de México fenotipadas con DXT no mostraron una asociación clara del polimorfismo -1584C>G y la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* ^{75,87}, mientras que en una población caucásica alemana fenotipada con SPT se encontró que los alelos *CYP2D6**1, *2 y *35 fueron fenotípicamente equivalentes ⁸⁶. Sin embargo, se ha encontrado que el alelo *CYP2D6**35 aparece frecuentemente en individuos mUMs sin duplicación del gen *CYP2D6* ⁸⁸. Un estudio *in vitro* ⁹⁰ describió que los polimorfismos del alelo *CYP2D6**35 que suponen un cambio en la secuencia de la proteína (*CYP2D6* 31G>A, Val11Met; *CYP2D6* 2850C>T, Arg296Cys; *CYP2D6* 4180C>G, Ser486Thr) no se asociaron a mayor expresión proteica ⁹⁰. Este resultado llevó a los autores del estudio a proponer que la asociación de *CYP2D6**35 con el fenotipo mUM de *CYP2D6* podría deberse a una proteína más eficiente ⁹⁰, si bien es cierto que el ligamiento de uno o varios de los SNPs *CYP2D6* 31G>A, *CYP2D6* 2850C>T, *CYP2D6* 4180C>G con otros

cambios en el DNA que supongan una mayor expresión enzimática, como podría ser la asociación de *CYP2D6* 31G>A con el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G⁸⁵, no puede ser descartado. Además, en un grupo de pacientes españoles que recibían tratamiento en monoterapia con tioridazina se encontró que los portadores de la variante *CYP2D6* -1584G presentaron un incremento de la actividad de la enzima *CYP2D6* frente a aquellos homocigotos para el alelo -1584C⁸⁹.

En resumen, los resultados anteriormente expuestos parecen indicar que podría existir una relación entre el SNP *CYP2D6* -1584C>G y una capacidad hidroxiladora incrementada de *CYP2D6*, aunque son necesarios más estudios para aclarar esta posible asociación. Como consecuencia de todo ello este ha sido uno de los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral como se explicita más adelante

5. VARIABILIDAD INTERÉTNICA DE CYP2D6

5.1 Variabilidad interétnica de CYP2D6 en poblaciones mundiales

La distribución de alelos del gen *CYP2D6*, así como de los grupos metabólicos mPMs y mUMs de *CYP2D6*, varía en función del origen étnico de la población. La publicación A7.2 analiza todos los estudios de frecuencias de *CYP2D6* realizados en distintas las poblaciones del mundo para detallar el patrón de distribución de los alelos *CYP2D6* y de los grupos metabólicos de *CYP2D6* según los grupos étnicos y regiones geográficas de las poblaciones. Los datos más relevantes de variabilidad se resumen a continuación.

Las Figuras 2 y 3 muestran la frecuencia de las principales variantes alélicas de *CYP2D6* en las diferentes áreas geográficas y grupos étnicos estudiados, respectivamente. *CYP2D6**4 es más frecuente en poblaciones caucásicas, mientras que *CYP2D6**10 es más frecuente en poblaciones del Este de Asia. Los alelos de actividad reducida *CYP2D6**17 y *29 son más frecuente en poblaciones de África y en africanos americanos. Por su parte, *CYP2D6**41 aparece más frecuentemente en poblaciones de Oriente Medio y el Sur de Asia, y la multiplicación de alelos activos *CYP2D6* muestra una mayor frecuencia en poblaciones de Oriente Medio, negras de África y europeas de la zona Sur y Mediterránea, con las frecuencias más altas de

CYP2D6*1xN o *2xN en una población de voluntarios sanos de Etiopía ⁸⁰ y otra de Arabia Saudita ⁹¹.

En coherencia con lo anteriormente expuesto, los metabolizadores lentos gPMs y mPMs CYP2D6 son más frecuentes en Europa y en poblaciones Caucásicas, mientras que la frecuencia del grupo gUM es mayor en poblaciones de Oriente Medio (10.54%) Por último, existen pocos trabajos que expongan claramente los datos de mUMs de CYP2D6, posiblemente debido a la falta de definición de este grupo, por ejemplo la no existencia una antimoda que separe mUMs de mEMs, tema discutido anteriormente.

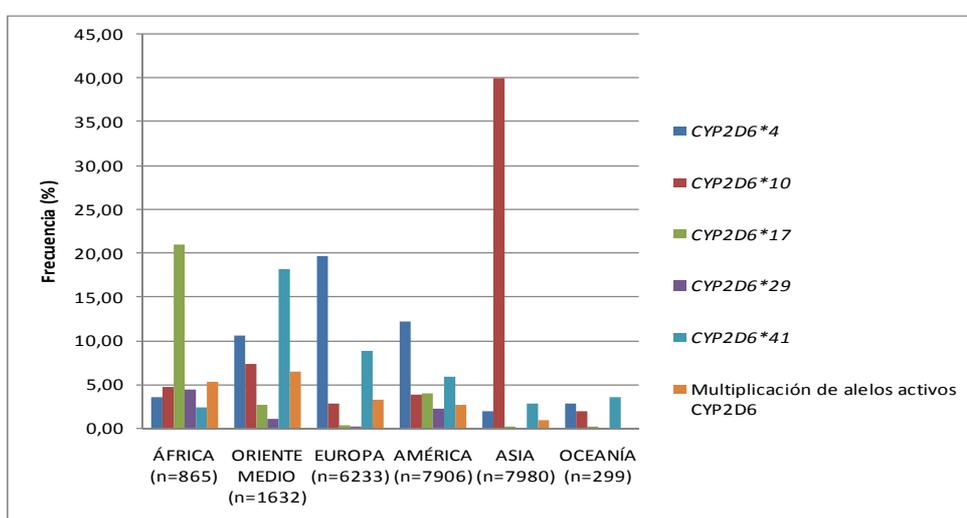


Figura 2. Frecuencia de las principales variantes alélicas de CYP2D6 en diferentes regiones geográficas. n = nº de individuos estudiados (Adaptada de la publicación A7.2).

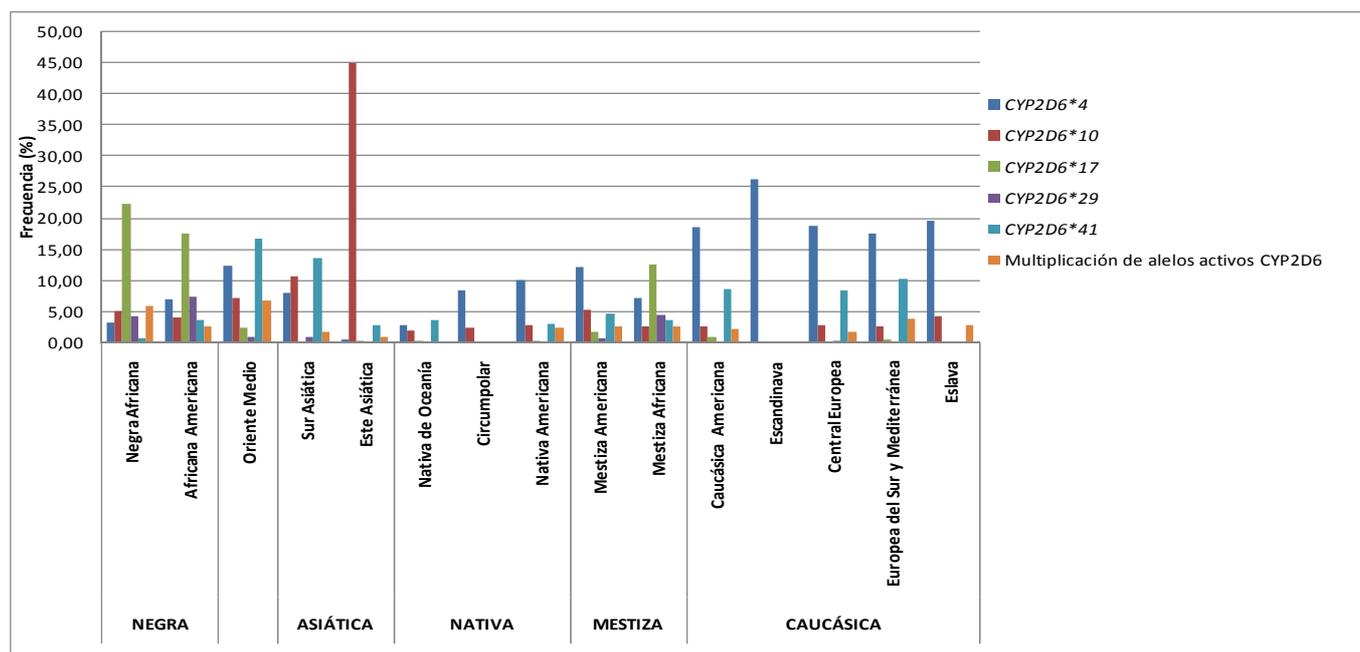


Figura 3. Frecuencia de las principales variantes alélicas de CYP2D6 en diferentes grupos étnicos.

5.2. Variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas.

La variabilidad en la respuesta a fármacos no solo se ha descrito entre individuos, sino también entre poblaciones con distinto origen étnico (publicación A7.2). Las poblaciones latinoamericanas poseen un origen híbrido, formado por diferentes grados de ancestría nativa americana o amerindia, caucásica (principalmente de españoles y portugueses) y africana^{92,93}, por tanto pueden existir poblaciones más o menos aisladas en los que se dé una preponderancia de un determinado grupo étnico. Por tanto, el conocimiento de las características farmacogenéticas de los diferentes grupos étnicos, independientemente del país de origen de los mismos, podría ser relevante para la implementación de estrategias terapéuticas adaptadas a ellos.

La revisión completa de los estudios de frecuencias CYP2D6 realizados en poblaciones iberoamericanas (que incluyen las poblaciones latinoamericanas junto a las de España y Portugal) puede consultarse en la publicación A7.1.

En la Tabla III se describen las frecuencias de multiplicación de genes activos *CYP2D6*, gUMs y mUMs en las poblaciones iberoamericanas estudiadas. Hasta la fecha solo dos grupos han sido estudiados determinando el fenotipo metabólico (mUMs), debe tenerse en cuenta que los voluntarios de Trinidad y Tobago⁶¹ fueron evaluados fenotípicamente con dextrometorfano, mientras que los de Cuba y Nicaragua con debrisoquina³⁰. De los 131 voluntarios sanos caucásicos cubanos fueron fenotipados con debrisoquina, pero solo 130 fueron genotipados, adicionalmente 129 voluntarios sanos mestizos cubanos fueron fenotipados con debrisoquina, pero solo 126 fueron genotipados. De los 133 voluntarios sanos nicaragüenses fueron fenotipados con debrisoquina, pero solo 98 fueron genotipados. Los análisis de los 243 mestizos mexicanos⁸⁴ incluyen los alelos *CYP2D6**1xN, *2xN y *10xN,, los resultados de FEG contabiliza los individuos con genotipo *CYP2D6**1/*10x2 como gUMs (9.1%), pero si estos individuos se eliminan el porcentaje de gUMs *CYP2D6* baja hasta un 6.2%. En los estudios de la población caucásica española^{95,96} la inclusión de alelos multiplicados sin actividad o con actividad disminuida no puede ser descartada.

En general, se ha descrito una frecuencia alta tanto en genes activos *CYP2D6* multiplicados como en gUMs de *CYP2D6* en poblaciones caucásicas, mientras que en el resto de grupos la frecuencia es muy variable (Tabla III). Cabe destacar que, a pesar de que las poblaciones nativas americanas son grupos aislados que pueden mostrar largas distancias genéticas del resto de poblaciones⁹⁴, solo han sido estudiados 12 grupos amerindios (Tabla III). Además, los estudios que reportan gUMs *CYP2D6* en España no distinguieron claramente si el gen *CYP2D6* multiplicado correspondía a un alelo con actividad normal o, por el contrario, a uno con actividad disminuida o nula^{95,96}, por lo que el porcentaje de gUMs de *CYP2D6* en la población española podría estar sobrerrepresentado.

I. Introducción

Tabla III. Descripción de las frecuencias de genes activos multiplicados *CYP2D6*, gUMs y mUMs de *CYP2D6* en poblaciones lberoamericanas de voluntarios sanos (n.e. = no evaluada. n = número de voluntarios estudiados).

Etnia predominante	Población	País	n	Multiplicación de genes activos <i>CYP2D6</i> (%)	gUMs (%)	mUMs+ (%)	Referencia
India	India	Trinidad y Tobago	167	1.5	3.6	1.8	61
Africana	Negra	Brasil	87	1.7	3.5	n.e.	97
	Negra	Costa Rica	49	7.2	8.2	n.e.	98,99
	Negra	Trinidad y Tobago	103	4.9	6.8	1.0	61
Nativa Americana	Karitana	Brasil	24	8.3	n.e.	n.e.	100
	Surui	Brasil	21	0.0	n.e.	n.e.	100
	Bribri	Costa Rica	47	0.0	0.0	n.e.	98,99
	Cabécar	Costa Rica	28	0.0	0.0	n.e.	98,99
	Chorotega	Costa Rica	32	1.6	3.1	n.e.	98,99
	Guatuso	Costa Rica	16	9.4	18.8	n.e.	98,99
	Guaymí	Costa Rica	26	0.0	0.0	n.e.	98,99
	Huétar	Costa Rica	48	3.1	6.3	n.e.	98,99
	Maya	México	25	6.0	n.e.	n.e.	100
	Tepehuana	México	99	1.5	3.3	n.e.	75
	Lacandones	México	154	1.3	2.6	n.e.	101
Tzotzil + Tzeltal	México	110	0.5	0.9	n.e.	102	
Caucásica	Caucásica	Cuba	131*	3.8	6.5	5.3	30
	Caucásica	Brasil	92	4.9	9.8	n.e.	97
	Caucásica	España	217	3.5 ⁼	7 ⁼	n.e.	95
	Caucásica	España	147	5.1 ⁼	10.2 ⁼	n.e.	96
	Caucásica	España	105	3.8	n.e.	n.e.	103
	Caucásica	España	347	4.1	n.e.	n.e.	30
	Caucásica	Portugal	100	6.1	8.4	n.e.	104
Mestiza	Mestiza	Colombia	121	1.2	1.7	n.e.	105
	Mestiza	Costa Rica	139	5.4	10.1	n.e.	98,99
	Mestiza	Cuba	129 ^Δ	4.7	4.8	2.3	30
	Mestiza	Ecuador	118	0.8	1.7	n.e.	76
	Mestiza	México	243	5.0 [*]	9.1 [§]	n.e.	84
	Mestiza	México	112	4.1	4.5	n.e.	75
	Mestiza	México	96	3.6	n.e.	n.e.	106
	Mestiza	México	100	1.5	3.0	n.e.	101
	Mestiza	México	102	3.9	7.8	n.e.	102
	Mestiza	Nicaragua	133 [#]	2.0	3.1	0.0	30
	Mestiza Mexicana	USA	349	1.0	0.8	n.e.	107
	Mestiza Mexicana	USA	50	3.0	2.0	n.e.	74
	Mestiza Mexicana	USA	264	0.4	0.4	n.e.	87

6. IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO CYP2D6

La enzima CYP2D6 se ha relacionado con el metabolismo de aproximadamente el 25% de los fármacos usados en clínica, como los antidepresivos amitriptilina, fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, venlafaxina y citalopram ^{9,21}. Sin embargo, CYP2D6 participa no solo en el metabolismo de sustancias exógenas como fármacos, sino también en el metabolismo de productos del metabolismo endógeno como monoaminas piscoactivas (p.ej., serotonina), endocannabinoides (p.ej., anandamida) u hormonas (p.ej., progesterona) ¹².

Así, la variabilidad en la capacidad metabólica de CYP2D6 podría influir, por un lado, en la aparición de efectos adversos o fallo en el tratamiento farmacológico, y por otro lado, en la tendencia a mostrar diferencias en determinados rasgos de personalidad, funciones neurocognitivas, y/o vulnerabilidad a psicopatología, como se desarrollará en los siguientes apartados y ha sido revisado recientemente ¹⁰⁸.

6.1. Relación entre la variabilidad de la capacidad funcional de CYP2D6 y el metabolismo de fármacos mediado por CYP2D6

La variabilidad en el metabolismo de los fármacos mediados por CYP2D6 puede tener, desde el punto de vista clínico, implicaciones importantes. Los fenotipos metabólicos PM y UM de CYP2D6 son particularmente relevantes debido a que podrían incrementar la susceptibilidad a reacciones adversas de fármacos o provocar un fallo en la respuesta al tratamiento farmacológico ^{109,110}. Como se ha comentado anteriormente, los individuos PMs no tienen actividad CYP2D6 apreciable, por lo que podrían presentar mayor cantidad de efectos adversos cuando los pacientes son tratados con sustratos de la enzima CYP2D6, debido principalmente a un aumento en las concentraciones plasmáticas del fármaco ^{2,34,35}. Por su parte, los sujetos UMs muestran un metabolismo incrementado mediado por CYP2D6 y, como consecuencia de ello, se ha descrito una tendencia a no responder a la administración de fármacos sustratos de la enzima CYP2D6 ^{111,112}. Por ejemplo, en relación al metabolismo mediado por CYP2D6 de fármacos antihipertensivos como el metoprolol, se ha mostrado que los PMs podrían tener una mayor concentración plasmática del fármaco, mejor respuesta farmacológica y, también, una mayor tendencia a sufrir efectos adversos ¹¹³⁻¹¹⁶, mientras que los individuos UMs parecían mostrar tendencia a un fallo en la respuesta terapéutica ¹¹⁴. Lo contrario se ha demostrado cuando a un

I. Introducción

paciente se le administra un profármaco inactivo que es transformado a su metabolito activo por la enzima CYP2D6, como ocurre con la codeína^{31,117} y el tamoxifeno^{118,119}.

Debido a la potencial relevancia clínica de los grupos funcionales de PMs y UMs de CYP2D6, la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la EMA han incluido información farmacogenética relativa al CYP2D6 en las fichas técnicas de algunos fármacos, como aripiprazol, codeína, haloperidol, nortriptilina o tramadol (para más información consultar la Tabla de Biomarcadores de la FDA¹²⁰ o las fichas técnicas de estos fármacos en la EMA¹²¹). De hecho, en los últimos años, se ha difundido una comunicación desde la FDA y la EMA, posteriormente replicada por las Agencias nacionales, entre ellas la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), en relación a los UMs de CYP2D6 y el uso de codeína^{122,123}.

La codeína es un profármaco O-demetilado por la enzima CYP2D6 al analgésico opioide farmacológicamente activo morfina. Algunos estudios han mostrado una disminución tanto en los niveles plasmáticos de morfina como en los niveles de analgesia en individuos PMs de CYP2D6¹²⁴⁻¹²⁶. Por el contrario, los individuos UMs convierten la codeína a morfina más rápidamente que el resto, lo que implica que los UMs de CYP2D6 poseen una mayor concentración plasmática de morfina y una mayor frecuencia de efectos adversos, como la sedación o la depresión respiratoria, en comparación con el resto de sujetos^{117,127}. Estos datos están apoyados en la literatura con varios trabajos que han mostrado graves intoxicaciones por morfina, en algunos casos letales, en niños UMs de CYP2D6 tras la ingesta de codeína o en bebés que estaban siendo amamantados y cuyas madres fueron UMs de CYP2D6 y estaban en tratamiento con este fármaco^{32,33,128-131}. Por todo ello, en el año 2013 la FDA modificó la ficha técnica de la codeína especificando que 1) dicho fármaco está contraindicado para el dolor post-quirúrgico tras una amigdalectomía y/o adenoidectomía en pacientes pediátricos, puesto que estos pacientes son particularmente sensibles a los efectos depresores respiratorios de la codeína cuando esta se metaboliza rápidamente a morfina y 2) se debe vigilar y monitorizar los signos de depresión respiratoria en niños que reciben codeína por otras causas, así como en las pareja madres-bebés cuando la madre esté amamantando a su hijo y, además, en tratamiento con codeína¹²². Recientemente, la EMA también ha restringido el uso de codeína, contraindicándolo para la tos y el resfriado en niños menores de 12 años y por cualquier causa en madres que estén

amamantando a sus hijos y en personas de cualquier edad que sean UMs de CYP2D6 ¹²³. Además, esta agencia no recomienda su uso en niños y adolescentes de entre 12 y 18 años con problemas respiratorios ¹²³. Estos datos ponen de manifiesto la importancia clínica de la variabilidad funcional de CYP2D6, especialmente el fenotipo metabólico UM de CYP2D6.

6.1.1. Relación entre la variabilidad funcional de CYP2D6 y el metabolismo de fármacos antidepresivos mediado por CYP2D6

Existen varios estudios que documentan el impacto clínico de los polimorfismos de CYP2D6 en la respuesta farmacológica y/o efectos adversos en relación al tratamiento antidepresivo, especialmente con la amitriptilina o la fluoxetina. Así, el metabolismo lento o ultrarrápido mediado por CYP2D6 se ha relacionado con concentraciones más altas y más bajas de fluoxetina respectivamente ^{9,132,133}. Estos resultados se apoyan en otros trabajos que han mostrado que los individuos PMs de CYP2D6 tienden a tener más reacciones adversas a fármacos antidepresivos metabolizados por la enzima CYP2D6, como la amitriptilina o la fluoxetina ^{112,117,134,135}, y que por el contrario, los individuos UMs se han asociado con una falta de respuesta al tratamiento farmacológico antidepresivo ^{111,112}.

Los fármacos antidepresivos amitriptilina o fluoxetina son usados para el tratamiento de condiciones psiquiátricas como los trastornos del comportamiento alimentarios (TCAs) ¹³⁶, el comportamiento suicida y la depresión mayor ¹³⁷, que pueden presentarse en un porcentaje importante de pacientes con TCAs ¹³⁸. Curiosamente, se conoce que aproximadamente un 30% de los pacientes en tratamiento con fármacos antidepresivos presentan discontinuación temprana durante la sexta semana de tratamiento ^{139,140}. Entre las razones más relevantes para explicar la discontinuación o abandono temprano del tratamiento están la presentación de reacciones adversas a los fármacos y el fallo o fracaso en la respuesta farmacológica ¹⁴¹, lo que podría deberse a la variabilidad interindividual en el metabolismo de estos fármacos.

A pesar de lo anteriormente expuesto, se conoce poco sobre la relación de CYP2D6 y la discontinuación en el tratamiento de fármacos antidepresivos sustratos CYP2D6. Solo un estudio ha analizado si los PMs CYP2D6 abandonan el tratamiento con fármacos antidepresivos sustratos de esta enzima con más frecuencia que el resto ¹⁴⁰, sobre la hipótesis de que este grupo metabólico debe sufrir mayores efectos adversos. Contrariamente a lo esperado, dicho estudio ¹⁴⁰ encontró que los individuos que habían sido clasificados genótipicamente como PMs

I. Introducción

(basándose únicamente en la determinación del alelo de actividad nula *CYP2D6*4*, por tanto, homocigotos portadores de dos alelos *CYP2D6*4*) no presentaban diferencias en el abandono del tratamiento antidepresivo en comparación con el resto de grupos genotípicamente clasificados. El hecho de que la frecuencia de abandono del tratamiento antidepresivo no fuera mayor en los PMs homocigotos para el alelo *CYP2D6*4* podría deberse a dos posibles aspectos. En dicho estudio ¹⁴⁰ no se determinaron otras variantes alélicas de *CYP2D6* que también dan lugar a proteínas con actividad nula (como *CYP2D6*3*, *5, *6) o con actividad reducida (por ejemplo *CYP2D6*10*, *17), con lo cual se deduce que el resto de posibles PMs no detectados se encontrarían en el grupo de EMs, disminuyendo las diferencias potenciales entre ambos. Otra posible razón por la que no se encontraron diferencias es la práctica común de iniciar el tratamiento con las dosis más bajas dentro del rango aprobado ¹⁴⁰, con el fin de que se minimicen los efectos adversos de los fármacos, y de esta manera, los PMs toleren mejor dichos efectos adversos. Sin duda, esta manera de prescribir los fármacos antidepresivos, si bien supone una ventaja y previene el abandono del tratamiento antidepresivo en PMs ¹⁴⁰, podría suponer una desventaja al incrementar la discontinuación del tratamiento en UMs.

Todos estos datos, como se explica a continuación, pueden estar relacionados a su vez con las asociaciones encontradas entre la variabilidad *CYP2D6* y la vulnerabilidad a psicopatología, y el riesgo de historia de intentos de suicidio, tentativa suicida severa y muerte por suicidio.

6.2. CYP2D6 y psicopatología

6.2.1. Metabolismo endógeno de CYP2D6

La enzima *CYP2D6* también está implicada en el metabolismo de sustancias endógenas como endocannabinoides, hormonas y, fundamentalmente, neurotransmisores ¹². Por ejemplo, algunos estudios *in vitro* han demostrado que *CYP2D6* participa en el metabolismo de la anandamida (endocannabinoide implicado en la regulación de varias funciones fisiológicas, con efectos neuroprotectores y antiinflamatorios) ^{142,143}, o de la progesterona ¹⁴⁴. En relación al metabolismo de neurotransmisores, se ha demostrado que *CYP2D6* participa en la formación de dopamina a partir de tiramina ¹⁴⁵ y también en la regeneración de serotonina desde 5-metoxitriptamina ²². Así, existen datos en humanos que observan diferencias en los niveles de serotonina basal en plaquetas en relación a los genotipos de *CYP2D6* ¹⁴⁶. En consecuencia, *CYP2D6* podría tener no

solo un papel directo en la vulnerabilidad a la enfermedad mental a través de la modulación del sistema serotoninérgico, sino que también podría tener uno indirecto a través del sistema dopaminérgico ²⁴, debido a la relación de equilibrio o compensación de estos dos sistemas en determinadas regiones del cerebro ^{23,24} donde también se expresa la enzima CYP2D6 ¹⁹.

6.2.2. Relación de la actividad CYP2D6 con rasgos de personalidad, vulnerabilidad a psicopatología, trastornos del comportamiento alimentario y suicidio.

Posiblemente debido a la implicación de CYP2D6 en el metabolismo de sustancias endógenas, se ha descrito previamente una relación entre la variación de CYP2D6 y rasgos de personalidad ^{49,147,148} y neurocognición ¹⁴⁸. En este sentido, los PMs de CYP2D6 se han relacionado con mayor ansiedad psíquica y menor grado de socialización, tanto en una población de voluntarios sanos de España como en una de Cuba analizadas con la Escala de Personalidad Karolinska (KSP, del inglés "Karolinska Scale Personality") ^{49,147}. Además, en ambas poblaciones también se encontró un patrón similar en los rasgos de psicastenia e inhibición de la agresión entre los diferentes grupos metabólicos CYP2D6, siendo mayor la puntuación de estas escalas en los individuos PMs de CYP2D6 ^{49,147}. Los PMs parecen mostrar rasgos de personalidad relacionados con impulsividad y perfeccionismo ¹⁴⁸, pero curiosamente parecen presentar menor psicopatología que los EMs ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. La menor vulnerabilidad a psicopatología parece estar de acuerdo con datos que muestran relación del fenotipo metabólico PMs con un mejor rendimiento de funciones cognitivas en tareas que miden atención sostenida y que implican mantenimiento de la respuesta de alerta y discriminación de estímulos en el tiempo resistiendo la fatiga ¹⁴⁸. Este resultado es además apoyado por estudios posteriores de Imagen por Resonancia Magnética Estructural y Funcional que demuestran diferencias en el volumen y la mejor función de regiones cerebrales que soportan la función cognitiva relacionada con la atención sostenida en los PMs ^{151,152}. Por el contrario, parece que los UMs de CYP2D6 podrían tener más vulnerabilidad a la psicopatología, como demostrarían los datos que han sido encontrados en un grupo de individuos que habían intentado suicidarse ¹⁵³. En este estudio, los individuos UMs fueron diagnosticados más frecuentemente con al menos un trastorno de personalidad que aquellos individuos con uno o ningún gen CYP2D6 activo ¹⁵³.

En relación a los UMs y apoyando las últimas observaciones, se ha encontrado recientemente una alta frecuencia de genes activos CYP2D6 en individuos con TCAs comparado con controles

I. Introducción

sanos ¹⁵⁴. La relación entre CYP2D6 y los TCAs requiere más estudios y puede ser debida, entre otros factores, a una falta de respuesta al tratamiento con fluoxetina (fármaco antidepresivo sustrato de CYP2D6), ya que es el fármaco de elección recomendado por la FDA para tratar los atracones alimentarios que se dan principalmente en el diagnóstico de Bulimia Nerviosa ¹⁵⁵, pero que también pueden darse en otros subtipos de TCAs ¹⁵⁶. Adicionalmente, parece que la alta frecuencia de individuos gUMs entre los sujetos con TCAs se da fundamentalmente en aquellos con historia de intento suicida ¹⁵⁷.

Específicamente, respecto del suicidio, se ha mostrado en una población forense sueca que los gUMs de CYP2D6 eran más frecuentes entre los individuos que murieron por suicidio en comparación con los que murieron por causa natural ¹⁵⁸. Otro estudio también mostró que en pacientes depresivos hospitalizados los gUMs tenían síntomas relacionados con mayor riesgo de cometer una tentativa suicida ¹⁵⁹. Además, en una población de supervivientes a la tentativa suicida, los gUMs fueron más frecuentes entre los que realizaban una tentativa severa asociada con mayor riesgo eventual de letalidad ¹⁶⁰. Por último, tan solo existe un trabajo más que analizó la relación CYP2D6 y riesgo de suicidio en un estudio multicéntrico europeo en población depresiva resistente a tratamiento farmacológico, pero no encontró ninguna asociación ¹⁶¹. Sin embargo, tanto la definición de gUMs CYP2D6 como la del riesgo de suicidio fueron mal definidas en este estudio, lo cual podría sesgar los resultados, como se detalla en la publicación A9.1.

En su conjunto, de los resultados expuestos anteriormente se puede resumir que un incremento de la actividad CYP2D6 podría correlacionarse con un aumento del riesgo tanto de sufrir un trastorno del comportamiento, posiblemente caracterizado por síntomas bulímicos, como de cometer una tentativa de suicidio. Estos datos podrían deberse, por un lado, a la falta de respuesta al tratamiento farmacológico más utilizado para estos problemas mentales, los antidepresivos y, por otro lado, a la implicación de CYP2D6 en el metabolismo de sustratos endógenos, como la serotonina, implicado en gran algunos casos en psicopatología.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN	45
2. ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS	48
3. OBJETIVO GENERAL	51
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51

|

II. Justificación y objetivos

|

1. JUSTIFICACIÓN

1. En relación a la capacidad hidroxiladora de CYP2D6, se han descrito los grupos de metabolizadores lentos (PMs), rápidos (EMs) y ultrarrápidos (UMs), con capacidad enzimática nula, normal e incrementada, respectivamente. La clasificación de individuos en estos grupos se puede llevar a cabo por la administración de un fármaco test en estudios de fenotipo metabólico, permitiendo distinguir los grupos metabólicos mPMs, mEMs y mUMs. El desarrollo de cócteles de fenotipación frente al uso de métodos selectivos supone una ventaja importante en este tipo de estudios, puesto que esta metodología permite medir la capacidad metabólica de varios CYPs simultáneamente ^{64,162,163}, mostrando además ventajas adicionales ⁶². Por todo ello, podría ser de interés diseñar y desarrollar un cóctel de fenotipación que permita medir la capacidad hidroxiladora de CYP2D6, junto a la de otras enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos habitualmente usados en la práctica clínica, como serían CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4.

Además, los grupos metabólicos de CYP2D6 pueden ser estimados a partir del genotipo *CYP2D6* con cierta exactitud ^{25,30}, diferenciándose los gPMs, gEMs y gUMs. Sin embargo, la relación entre gUMs y mUMs solo explica una parte del mUM de CYP2D6 observado ^{30,59,77}. El SNP *CYP2D6* -1584C>G podría ajustar dicha relación, puesto que se ha asociado *in vitro* a una mayor expresión de CYP2D6 ³⁶, *in vivo* a una mayor capacidad hidroxiladora CYP2D6 ⁸⁹, y, además, se ha encontrado en individuos mUMs de CYP2D6 que no presentan multiplicaciones de *CYP2D6* ⁸⁸. Sin embargo, otros trabajos han mostrado resultados contradictorios ^{75,86,87}. En base a los resultados anteriores podría ser interesante evaluar la relación entre *CYP2D6* -1584C>G y la capacidad hidroxiladora CYP2D6 en una población de voluntarios sanos evaluada previamente con un fármaco test, con el fin de aclarar la influencia o no de este SNP en la capacidad hidroxiladora CYP2D6.

Adicionalmente, y debido a que los estudios de administración de un fármaco test quedarían restringidos a voluntarios sanos, se ha propuesto alternativamente que la determinación de la concentración plasmática de fármaco y metabolito principal puede ser usada como una medida de la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 en pacientes ^{47,48}.y, además, podría ser de utilidad para el estudio de interacciones entre fármacos en pacientes tratados con amitriptilina, tioridazina o risperidona en politerapia y con diferente genotipo *CYP2D6* ^{69,70}. Sin embargo,

II. Justificación y objetivos

ningún estudio similar ha sido realizado con aripiprazol, a pesar de ser uno de los fármacos más prescritos actualmente en pacientes psiquiátricos ¹⁶⁴, normalmente en politerapia farmacológica ¹⁶⁵⁻¹⁶⁸, por lo que podría estar justificado su estudio.

2. Por otro lado, se ha demostrado que existe variabilidad en las frecuencias de alelos y fenotipos metabólicos de CYP2D6 en poblaciones con diferente origen étnico. Sin embargo, únicamente se han estudiado 12 grupos de nativos americanos en relación a las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs de CYP2D6. Todo ello a pesar de que estos grupos pueden ser muy variables entre sí, y de que el metabolismo incrementado de CYP2D6 se ha relacionado con fallos terapéutico ^{111,112} y con la aparición o incremento de efectos adversos ^{117,131} en pacientes tratados con sustratos CYP2D6. Así, parece necesaria la caracterización de las frecuencias de los UMs de CYP2D6 en más poblaciones amerindias, lo que ayudaría a generar patrones de prescripción de fármacos ajustados a los perfiles de cada una de estas poblaciones, especialmente teniendo en cuenta la psicopatología asociada a los UMs.

Igualmente, pocos estudios analizaron las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs de CYP2D6 en las poblaciones de España y Portugal ^{30,95,96,103,104}. El único trabajo en la población de Portugal incluyó solo 100 voluntarios sanos ¹⁰⁴. Además, de los estudios llevados a cabo en la población española, solo dos de ellos ^{30,103} discriminan claramente si los alelos multiplicados *CYP2D6* tienen actividad normal, disminuida o nula. En consecuencia con lo anterior, el porcentaje de gUMs CYP2D6 descrito en la población española podría ser incorrecto, puesto que los estudios que dan dicho porcentaje son los que no discriminan cuál es el alelo *CYP2D6* multiplicado ^{95,96}. Por tanto, son necesarios más estudios con un mayor número de voluntarios en poblaciones ibéricas de España y Portugal, en los que se identifique el alelo *CYP2D6* multiplicado, con el fin de describir con la mayor exactitud posible las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs.

Además, los actuales trabajos de frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2D6* analizan prioritariamente la variabilidad en diferentes países. Sin embargo, podría ser interesante, independientemente del país, el estudio descriptivo de estas frecuencias en poblaciones iberoamericanas con origen étnico amerindio, africano, caucásico y judío identificado, que representan, respectivamente, los 3 componentes ancestrales mayoritarios de Latinoamérica y un grupo adicional minoritario de la zona. Por tanto, el conocimiento de las frecuencias alélicas y

genotípicas de *CYP2D6* en cada población con un específico componente ancestral podría ser utilizado para optimizar, al menos en parte, la terapia farmacológica en Latinoamérica, con recomendaciones específicas no por países, sino por el origen étnico de las poblaciones y grupos específicos. Este es el objetivo principal del Consorcio CEIBA de la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (RIBEF), en el que se desarrolla este estudio.

3. Finalmente, se ha encontrado una mayor frecuencia de genes activos *CYP2D6* en pacientes con TCAs que en controles sanos ¹⁵⁴. Así, se podría pensar que el metabolismo incrementado de *CYP2D6* podría aumentar el riesgo de desarrollar síntomas relacionados con TCAs. Sin embargo, no existe en la actualidad ningún estudio que analice este riesgo en una población de voluntarios sanos. Además, varios estudios han relacionado los gUMs con el suicidio consumado ¹⁵⁸, la historia de tentativa suicida en pacientes con TCAs ¹⁵⁷, el riesgo de suicidio en pacientes resistentes al tratamiento antidepresivo ¹⁵⁹ y la severidad del intento suicida ¹⁶⁰. Sin embargo, son necesarios más estudios que repliquen estos resultados en otras poblaciones. Así, con el fin de replicar un estudio anterior ¹⁵⁷ se pretende estudiar la relación entre el UM de *CYP2D6* y la historia de tentativa suicida en una población diferente de pacientes diagnosticados con TCAs. Por último, el UM de *CYP2D6* se ha relacionado con la no respuesta al tratamiento antidepresivo ¹¹¹. Este resultado podría, a su vez, apoyar la relación entre el metabolismo incrementado de *CYP2D6* y suicidio, bajo la hipótesis de que si los pacientes no responden al tratamiento, podrían dejarlo y consecuentemente cometer una tentativa suicida. Por ello, podría ser de utilidad clínica estudiar la relación entre el metabolismo incrementado de *CYP2D6* y la discontinuación del tratamiento antidepresivo con sustratos de la enzima *CYP2D6*, como son la fluoxetina y la amitriptilina.

En resumen, el metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* parece uno de los grupos funcionales de mayor relevancia por sus potenciales implicaciones clínicas. Los UMs podrían presentar, por una parte, niveles disminuidos de fármacos, lo que podría condicionar el abandono de la terapéutica. Por otra parte, en base a su participación en el metabolismo endógeno, los UMs podrían relacionarse con psicopatología. El estudio de la relación de los UMs de *CYP2D6* con riesgo de TCA en población sana (VIII), de suicidio en pacientes (IX) o abandono de tratamiento con antidepresivos (X) conforman los estudios del Bloque 3 de esta Tesis Doctoral. En consonancia con la relevancia clínica hipotetizada para el fenotipo UMs, el Bloque 1 estudia las diferentes

II. Justificación y objetivos

formas de objetivarlo (mediante un fármaco test-asociado a otros en un cóctel (I), la optimización de la relación fenotipo/genotipo (II) o durante la monitorización terapéutica (III). Además, en base a la relevancia clínica comentada y a la posible existencia de una proporción mayor de UMs en la población ibérica, se justifica el estudio de su potencial variabilidad interétnica de la península ibérica y Latinoamérica: España (IV), Portugal (V), México (VI) y el consorcio CEIBA de la Red RIBEF que incluye 19 países Iberoamericanos (VII).

2. ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS

La presente Tesis Doctoral estudia los UMs del CYP2D6 en tres aspectos diferentes: la metodología de identificación de estos individuos, su frecuencia en distintas poblaciones iberoamericanas, y, por último, su relación con psicopatología, factor de riesgo de enfermedad y de asociación al suicidio en TCA, o de abandono del tratamiento con antidepresivos. Los tres bloques en se ha dividido la Tesis Doctoral se corresponden a los tres objetivos generales, relacionadas a las tres preguntas respecto de los CYP2D6 UMs: ¿Cómo se identifican?, ¿varían entre poblaciones? y ¿qué relación tienen con psicopatología y abandono del tratamiento?.

Por todo lo anteriormente expuesto, la presente Tesis Doctoral presenta tres bloques de estudios (Bloques 1, 2 y 3), correspondientes a los apartados expuestos en la justificación.

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.

Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4

Estudio II. Estudio de la influencia del polimorfismo del promotor *CYP2D6* -1584C>G en la capacidad metabólica de CYP2D6

Estudio III. Estudio de la relevancia del genotipo *CYP2D6* y las interacciones farmacológicas en el índice metabólico de aripiprazol

BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6

Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México

Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de España

Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal

Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas

BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6

Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba

Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México

Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México

La Tabla IV muestra la correspondencia entre los diferentes estudios y las publicaciones incluidas en la presente Tesis Doctoral. Aunque la mayoría de estudios corresponden con una publicación, para la fundamentación de la hipótesis y discusión de los resultados en los Estudios VII y IX se han realizado una o varias publicaciones adicionales (A7.1, A7.2 y A9.1). Igualmente, la metodología de los Estudios III y VII se ha publicado por separado (A3.1 y A7.3). En total, la presente Tesis Doctoral consta de 10 estudios que engloban 15 publicaciones, que se listan en el apartado 4 de los anexos.

II. Justificación y objetivos

Tabla IV. Correspondencia entre los Estudios y publicaciones incluidos en la presente Tesis Doctoral

ESTUDIOS DE LA TESIS DOCTORAL	PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL	PUBLICACIONES PARA LA GENERACIÓN DE HIPÓTESIS Y/O METODOLOGÍA
BLOQUE 1. FENOTIPO METABÓLICO		
Estudio I. Cóctel de fenotipación	A1	
Estudio II. CYP2D6 -1584C>G	A2	
Estudio III. MR ARI/DARI	A3.2	A3.1
BLOQUE 2. VARIABILIDAD INTERÉTNICA		
Estudio IV. México	A4	
Estudio V. España	A5	
Estudio VI. Portugal	A6	
Estudio VII. Iberoamérica	A7.4	A7.1, A7.2 y A7.3
BLOQUE 3. IMPLICACIONES CLÍNICAS EN SALUD MENTAL		
Estudio VIII. Riesgo TCAs	A8	
Estudio IX. Suicidio TCAs	A9.2	A9.1
Estudio X. Discontinuación antidepresivos	A10	

El listado de las publicaciones (A1 – A10) puede consultarse en el apartado 4 de los Anexos.

3. OBJETIVO GENERAL

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general estudiar el polimorfismo metabólico CYP2D6, específicamente los metabolizadores ultrarrápidos, en tres aspectos: determinar la metodología de identificación (relación fenotipo/genotipo metabólico), estudiar la variabilidad poblacional del metabolismo incrementado de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas y analizar la implicación clínica del mismo en aspectos de salud mental (trastornos del comportamiento alimentario, suicidio y evaluación de la respuesta a antidepresivos).

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO

Estudio I. Cóctel de fenotipación

I.1. Diseñar un cóctel de fenotipación capaz de medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4

Estudio II. *CYP2D6* -1584C>G

II.1. Evaluar la relación entre el polimorfismo de *CYP2D6* -1584C>G y el índice metabólico de *CYP2D6* debrisoquina/4-hidroxi-debrisoquina en voluntarios sanos

Estudio III. MR ARI/DARI

III.1. Desarrollar un método de HPLC para el análisis de aripiprazol y dehidroaripiprazol en plasma humano

III.2. Analizar la relación entre el número de genes activos *CYP2D6* y el MR aripiprazol/dehidroaripiprazol.

BLOQUE 2. VARIABILIDAD INTERÉTNICA

Estudio IV. México

IV.1. Analizar la variabilidad del fenotipo metabolizador ultrarrápido en poblaciones amerindias del noroeste de México

Estudio V. España

V.1. Determinar la frecuencia del fenotipo metabolizador ultrarrápido en una población de

II. Justificación y objetivos

España

Estudio VI. Portugal

VI.1. Determinar la frecuencia del fenotipo metabolizador ultrarrápido en una población de Portugal

Estudio VII. Iberoamérica

VII.1. Analizar la variabilidad del fenotipo metabolizador ultrarrápido en poblaciones iberoamericanas de diferente origen étnico

BLOQUE 3. IMPLICACIONES CLÍNICAS EN SALUD MENTAL

Estudio VIII. Riesgo TCAs

VIII.1. Determinar si existe relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de Cuba

Estudio IX. Suicidio TCAs

IX.1. Determinar si existe relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la historia de intento de suicidio en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México

Estudio X. Discontinuación antidepresivos

X.1. Determinar si existe relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana en el tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	55
2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN.....	56
2.1. Análisis genético <i>CYP2D6</i>	56
2.2. Desarrollo de un método para analizar las concentraciones de aripiprazol y su principal metabolito dehidroaripiprazol	57
3. MÉTODOLOGÍA.....	58
3.1. Propuesta de un cóctel de fenotipación	58
3.2. Análisis genético del <i>CYP2D6</i>	58
3.3. Determinación de los fenotipos metabólicos estimados a partir del genotipo <i>CYP2D6</i>	63
3.4. Asignación del origen étnico de cada individuo	64
3.5. Medida de la capacidad hidroxiladora del <i>CYP2D6</i> a partir de la administración del fármaco test debrisoquina.....	64
3.6. Análisis cromatográfico de aripiprazol y su metabolito.....	65
3.7. Evaluación del riesgo de desarrollar síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario.....	66
3.8. Evaluación de la historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario.....	67
3.9. Evaluación de la discontinuación del tratamiento antidepresivo en pacientes diagnosticados con depresión mayor.....	67
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	67
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	68

La metodología de los estudios de la presente Tesis Doctoral, así como los materiales utilizados, puede consultarse en detalle en las publicaciones A1 – A10.

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los estudios de esta Tesis Doctoral fueron realizados en voluntarios sanos (n=5229; Estudios II, IV, V, VI, VII y VIII), pacientes psiquiátricos en tratamiento con aripiprazol (n=22; Estudio III), pacientes con TCAs (n=204; Estudio IX) y pacientes con trastorno depresivo mayor (n=100; Estudio X) (Tabla V). En total, 5229 voluntarios sanos y 326 pacientes han sido estudiados en los estudios de la presente Tesis Doctoral.

Los países de procedencia de los 5555 individuos incluidos en los estudios de la presente Tesis Doctoral fueron Argentina (mestizos del Estudio VII), Brasil (mestizos del Estudio VII), Colombia (mestizos del Estudio VII), Costa Rica (mestizos, amerindios y africanos del Estudio VII), Cuba (Estudio II, VIII y mestizos, caucásicos y africanos del VII), Ecuador (mestizos del Estudio VII), México (Estudio IV, IX, X y mestizos y amerindios del VII), Nicaragua (Estudio II y mestizos del VII), Perú (mestizos y amerindios Estudio VII), Uruguay (mestizos del Estudio VII), España (Estudio III, V y caucásicos del VII) y Portugal (Estudio VI y caucásicos del VII).

La determinación genotípica (salvo para el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G) y del MR DBQ/4-OHDBQ de los Estudios II y VIII fue realizada con anterioridad al inicio de la presente Tesis Doctoral^{30,147}, aunque el análisis de los datos realizado en la Tesis es original. Además, parte de las frecuencias alélicas y de FEGs del Estudio VII se han publicado previamente por países^{30,76,98,101}, aunque es la primera vez que se analizan todas las muestras en conjunto por grupo étnico e independientemente del país de origen.

Tabla V. Descripción general de los estudios de la presente Tesis.

Estudio	Población	Etnia	n	Determinación
II	VS	Mestiza	320	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i> * DBQ y 4-OHDBQ en orina*
III	Pacientes psiquiátricos	Caucásica	22	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i> ARI y DARI en plasma
IV	VS	Amerindia	508	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i>
V	VS	Caucásica	805	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i>
VI	VS	Caucásica	300	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i>
VII	VS	Amerindia	1376	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i>
		Caucásica	1506	
		Africana	83	
		Ashkenazi	173	
		Mestiza	2102	
VIII	VS mujeres	Mestiza	159	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i> * DBQ y 4-OHDBQ en orina* Riesgo de síntomas de TCAs
IX	Pacientes con TCA	Mestiza	204	Variantes alélicas y FEGs <i>CYP2D6</i> Historia de tentativa suicida previa
X	Pacientes con MDD	Mestiza	100	Variantes alélicas <i>CYP2D6</i>

* La determinación genotípica (salvo para el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G) y del MR DBQ/4-OHDBQ de los Estudios II y VIII fue realizada con anterioridad al inicio de la presente Tesis Doctoral^{30,146}, aunque el análisis de los datos realizado en la Tesis es original. n = número de individuos. VS = voluntarios sanos. FEGs = fenotipos extrapolados de genotipos. DBQ = debrisoquina. 4-OHDBQ = 4-hidroxidebrisoquina. ARI = aripiprazol. DARI = dehidroaripiprazol. TCAs = trastornos del comportamiento alimentario. MDD = trastorno depresivo mayor. n° de individuos estudiados en total = 5555

2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

2.1. Análisis genético *CYP2D6*

Para la determinación de genotipos del *CYP2D6* se utilizaron muestras de sangre que fueron extraídas en un tubo con EDTA potásico (Vacutainer®, BD, USA). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la extracción del DNA con el QIAamp®DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Los polimorfismos genéticos de *CYP2D6* se estudiaron siguiendo técnicas previamente descritas por el grupo de investigación en publicaciones anteriores ^{76,169}. En las reacciones en cadena de la polimerasa extra largas (XL-PCR) y las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales se utilizaron la mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y oligonucleótidos suministrados por Stab Vida (Lisboa, Portugal). En la XL-PCR se utilizó una mezcla de enzimas Taq y Pwo DNA polimerasas Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), y en las reacciones de PCR convencionales se utilizó BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline, Londres, Reino Unido). Todas estas reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania).

Los análisis de PCR a tiempo real (PCR-RT) fueron realizados en un Fast 7300 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando como reactivos sondas TaqMan® (ver Tabla II) y TaqMan® Universal PCR Master Mix. El estudio de la variación del número de copias (CNV) requirió además del reactivo TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, RNase P. Todos estos reactivos fueron suministrados por Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

2.2. Desarrollo de un método para analizar las concentraciones de aripiprazol y su principal metabolito dehidroaripiprazol

Las soluciones estándar madre de ARI y DARI ((Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ, USA) fueron preparadas en metanol a una concentración de 200 µg/mL. La prometazina, utilizada como estándar interno (IS), fue suministrada por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) y la solución stock estándar fue preparada también en metanol a una concentración de 1.46 mg/mL. Todas las soluciones madre estándar fueron almacenadas en ausencia de luz a una temperatura de -20 °C hasta su uso. Las soluciones de trabajo de aripiprazol y dehidroaripiprazol fueron preparadas por dilución de las soluciones madre con metanol a concentraciones de 0.5, 1 y 10 µg/mL, mientras que la de prometazina se preparó a una concentración de 14.6 µg/mL. Estas soluciones de trabajo se almacenaron a 4 °C en ausencia de luz. Igualmente, para las curvas analíticas, las soluciones de estándar de cada analito desde 10 a 1000 ng/mL fueron preparadas a partir de la dilución de las soluciones de trabajo.

El dietil éter y el acetonitrilo de calidad HPLC usado para el proceso de extracción, la solución de ácido hidrocórico al 37% y el hidróxido sódico de grado analítico fueron proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania). El metanol de grado HPLC, ácido acético y el sulfato sódico de

grado analítico utilizados en los análisis cromatográficos fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El agua fue purificada por deionización usando un sistema Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

Un cromatógrafo líquido 118 Beckman-Coulter (Beckman-Coulter Palo Alto, CA, USA) equipado con una bomba solvente (modelo 118), una válvula de inyección Rheodyne (modelo 7725i) y un detector UV (modelo 166) fue utilizado para determinar las concentraciones de ARI y DARI. Los datos fueron adquiridos y la instrumentación controlada usando un software Beckman 32 Karat v 2.1 (Beckman, Fullerton, CA, USA). El análisis de las muestras se llevó a cabo usando a columna modificada con grupos fenilo (ACE Phenyl, 250x4.6 mm I.D., con tamaño de partícula 5 µm) suministrado por Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Scotland).

3. METODOLOGÍA

3.1. Propuesta de un cóctel de fenotipación

Para poder llevar a cabo la propuesta del cóctel de fenotipación del Estudio I, se realizó una revisión de la literatura, con el objetivo de conocer otros cócteles de fenotipación que utilizados para medir la capacidad hidroxiladora de las enzimas CYP. Los estudios fueron revisados con el fin de encontrar la combinación idónea de fármacos test que permitiera, de una manera eficaz y segura, medir el fenotipo metabólico de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 simultáneamente. La revisión detallada puede consultarse en la publicación A1. La propuesta del cóctel forma parte de la metodología seguida por el Consorcio CEIBA de la RIBEF para el análisis de muestras (publicación A7.3).

3.2. Análisis genético del *CYP2D6*

El análisis genético del *CYP2D6* realizado en los Estudios II–X se basó en métodos de genotipado de uso habitual en el laboratorio del equipo de investigación y previamente descritos^{76,169}. Estos análisis forman parte de la metodología seguida por el Consorcio CEIBA de la RIBEF para el análisis de muestras (publicación A7.3).

3.2.1. Detección de duplicaciones en *CYP2D6*

Para determinar si los individuos portaban duplicaciones del *CYP2D6* se llevó a cabo una XL-PCR, donde se amplifica un fragmento específico de la duplicación (3.5kb), utilizando los oligonucleótidos 2D6dupl-F y 2D6dupl-R¹⁷⁰ (Tabla VI). Además se amplifica en la misma PCR el

gen completo *CYP2D6* (5.1 kb), utilizando esta vez los oligonucleótidos DPKup y DPKlow¹⁷¹ (Tabla VI). La mezcla de PCR consistió en reacciones de 25 μ L que contenían 0.375 μ L de una mezcla de enzimas Taq y Pwo DNA polimerasas Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 2.5 μ L de PCR buffer 3 (2.75 mM MgCl₂, Expand Long Template PCR System), 0.5 mM de cada dNTP (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade; Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y 0.4 μ M de cada oligonucleótido.

Tabla VI. Secuencia de nucleótidos de los diferentes oligonucleótidos utilizados para la determinación de distintas variantes alélicas de *CYP2D6*.

Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos <i>CYP2D6</i>
DPKup	5'- GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A -3'
DPKlow	5'- GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA -3'
2D6 dupl-F	5'- CCT GGG AAG GCC CCA TGG AAG -3'
2D6 dupl-R	5'- CAG TTA CGG CAG TGG TCA GCT -3'
5' 2D6*5	5'- CAC CAG GCA CCT GTA CTC CTC -3'
3' 2D6*5	5'- CAG GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C -3'
5' 2D6.dup	5'- GCC ACC ATG GTG TCT TTG CTT TCC TGG -3'
3' 2D6.dup	5'- GGT TTC TTG GCC CGC TGT CCC CAC TC -3'

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 2 minutos de desnaturalización a 94 °C, 10 ciclos de 95 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 4 minutos, 20 ciclos de 95 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 4 minutos (incrementando 5 segundos por ciclo), y un paso de extensión final de 7 minutos a 68 °C.

El producto de PCR se analizó directamente en un gel de 0.8% de agarosa. Se visualizó el ADN con bromuro de etidio. Esta XL-PCR genera un fragmento de 5.1 kb, correspondiente a la amplificación de *CYP2D6*, y un fragmento de 3.5 kb si existe algún alelo multiplicado.

3.2.2. Detección de *CYP2D6*5*

Para determinar si los individuos portaban el alelo *CYP2D6*5* se llevó a cabo una XL-PCR, donde se amplifica un fragmento específico del *CYP2D6*5* (3.5 kb), utilizando los oligonucleótidos 5'2D6*5 y 3'2D6*5¹⁷² (Tabla VI). Además se amplifica en la misma PCR el gen

completo CYP2D6 (5.1 kb), utilizando los oligonucleótidos DPKup y DPKlow¹⁷¹ (Tabla VI). La mezcla de PCR consistió en reacciones de 25 µL que contenían 0.375 µL de una mezcla de enzimas Taq y Pwo DNA polimerasas Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 2.5 µL de PCR buffer 3 (2.75 mM MgCl₂, Expand Long Template PCR System), 0.5 mM de cada dNTP (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade; Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y 0.4 µM de cada oligonucleótido.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Las condiciones fueron: 2 minutos de desnaturalización a 94 °C, 10 ciclos de 95 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 4 minutos, 20 ciclos de 95 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 4 minutos (incrementando 5 segundos por ciclo), y un paso de extensión final de 7 minutos a 68 °C.

El producto de PCR se analizó directamente en un gel de 0.8% de agarosa. Se visualizó el ADN con bromuro de etidio. Esta XL-PCR genera un fragmento de 5.1 kb, correspondiente a la amplificación de CYP2D6, y un fragmento de 3.5 kb si está presente el alelo *CYP2D6*5*.

3.2.3. Detección de CYP2D6*2, *3, *4, *6, *10, *17, *29, *35 y *41

La detección de los alelos *CYP2D6*2, *3, *4, *6, *10, *17, *29, *35 y *41* se llevó sobre ADN genómico utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) disponibles comercialmente (Tabla VII). El genotipo se basó en la determinación de SNPs asociados con los alelos de interés. El alelo *CYP2D6*4* se determinó por la presencia de los SNPs *CYP2D6 100C>T* y *1846G>A*, mientras que el alelo *CYP2D6*10* fue determinado por la presencia únicamente del SNP *CYP2D6 100C>T*. Igualmente la presencia del alelo *CYP2D6*2* se confirma por la presencia de *CYP2D6 -1584C>G* y *2850C>T*, mientras que la del *CYP2D6*35* lo hace por la presencia de *CYP2D6 -1584C>G* y *31G>A*. Los SNPs clave del resto de alelos pueden consultarse en la Tabla VII. Cuando ninguno de los alelos analizados fueron detectados, se asumió a la muestra el alelo *CYP2D6 wt*.

El análisis se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, utilizando para cada muestra un volumen de 10 µL que contenía 5 µL de Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, que contiene AmpliTaq Gold DNA polimerasa, dNTPs, buffers y un control interno basado en la presencia del fluoróforo ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), y 0.5 µL de la sonda TaqMan® específica para cada SNP (TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). En cada placa se incluyeron controles negativos (sin DNA) y controles positivos (heterocigotos y/o homocigotos).

Tabla VII. Descripción de las sondas TaqMan®, Código rs y SNPs *CYP2D6* clave utilizados para identificar diferentes alelos de *CYP2D6*.

Alelo <i>CYP2D6</i>	Sonda TaqMan®	Código rs	SNP <i>CYP2D6</i>
<i>CYP2D6*2</i>	C_32407252_30	rs1080385	-1584C>G
	C_27102425_10	rs16947	2850C>T
<i>CYP2D6*3</i>	C_32407232_50	rs35742686	2549delA
<i>CYP2D6*4</i>	C_27102431_D0	rs3892097	1846G>A
<i>CYP2D6*6</i>	C_32407243_20	rs5030655	1707delT
<i>CYP2D6*10</i>	C_11484460_40	rs1065852	100C>T
<i>CYP2D6*17</i>	C_2222771_40	rs28371706	1023C>T
<i>CYP2D6*29</i>	C_34816113_20	rs59421388	3183G>A
<i>CYP2D6*35</i>	C_27102444_80	rs769258	31G>A
<i>CYP2D6*41</i>	C_34816116_20	rs28371725	2988G>A
<i>CNV (CYP2D6xN)</i>	Hs_00010001_cn		

N ≥ 2.

Las reacciones de PCR-RT se llevaron a cabo en un Fast 7300 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de amplificación fueron 1) preincubación a 95 °C durante 10 minutos, para activar la Taq DNA polimerasa, 2) 40 ciclos de desnaturalización a 92 °C durante 15 segundos seguidos por una extensión durante 1 minuto a 60 °C.

3.2.4. Detección del número de copias *CYP2D6xN*

El estudio de la variación del número de copias (CNV) del *CYP2D6* se llevó a cabo mediante PCR-RT, utilizando la sonda TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) disponible comercialmente Hs00010001_cn, que detecta secuencias en el exón 9 del *CYP2D6* y no amplifica los pseudogenes *CYP2D7* o *CYP2D8*, ni tampoco alelos *CYP2D6* que posean secuencias del pseudogén *CYP2D7* en el exón 9 (p.ej., *CYP2D6*36*).

El análisis se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, utilizando para cada muestra un volumen de 20 µL que contenía 10µL de Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, que contiene AmpliTaq Gold DNA polimerasa, dNTPs, buffers y un control interno basado en la presencia del fluoróforo ROX, 1 µL de la sonda TaqMan® Copy Number Variation Hs00010001_cn (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), y 1 μ L TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, RNase P.

Las reacciones de PCR-RT se llevaron a cabo en un Fast 7300 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones de amplificación 1) preincubación a 95 °C durante 10 minutos, para activar la Taq DNA polimerasa, 2) 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos seguidos por una extensión durante 1 minuto a 60 °C.

3.2.5. Detección de (*wt* o *2)*xN* y (*4 o *10)*xN*

En el caso de que la muestra fuera positiva para duplicación de *CYP2D6*, se realizó una PCR anidada para detectar si el alelo multiplicado era un alelo con actividad normal (*CYP2D6*(*wt* o *2)*xN*), sin actividad (*CYP2D6**4) o con baja actividad (*CYP2D6**10).

En primer lugar se llevó a cabo un PCR que genera un fragmento de 10 kb. Se utilizaron los primer 5'2D6.dup y 3'2D6.dup (Tabla VI). La mezcla de PCR consistió en reacciones de 25 μ L que contenían 0.375 μ L de una mezcla de enzimas Taq y Pwo DNA polimerasas Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 2.5 μ L de PCR buffer 2 (2.75 mM MgCl₂, Expand Long Template PCR System), 0.5 mM de cada dNTP (Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade; Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 0.3 μ M de cada oligonucleótido y entre 50-100 ng/ μ L de ADN genómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Las condiciones fueron: 2 minutos de desnaturalización a 94 °C, 10 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 9 minutos y 30 segundos, 20 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 9 minutos y 30 segundos (incrementando 10 segundos por ciclo), y un paso de extensión final de 11 minutos a 68 °C.

El producto de PCR se utilizó como ADN molde para realizar un análisis de PCR-RFLP, que detectó la presencia o ausencia del SNP *CYP2D6* 100C>T en el alelo multiplicado. Todas las reamplificaciones se llevaron a cabo en reacciones de 25 μ L que contenían 0.5 U de EcoTaq polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase; Bioline, Londres, Reino Unido), 2.5 μ L de PCR Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase; Bioline, Londres, Reino Unido), 0.6 μ L de MgCl₂ 50mM y 2 μ M de cada oligonucleótido (5'2D6*10 y 3'2D6*10).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Las condiciones fueron: 2 minutos de desnaturalización a 94 °C, 33 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 1 minuto, y un paso de extensión final de 7 minutos a 72 °C. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler 384 (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania).

Por último, se llevó a cabo la digestión del producto de PCR en un volumen final de 20 µL que contenía 4 µL del producto de la última PCR utilizando, 1 µL de la enzima Scal y 2 µL Buffer (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). La digestión con esta enzima genera dos fragmentos de 206 pb y de 35 pb si está presente el SNP *CYP2D6* 100C>T, y un fragmento de 241 pb si no está presente.

3.3. Determinación de los fenotipos metabólicos estimados a partir del genotipo *CYP2D6*

Tras la determinación alélica y genotípica de *CYP2D6*, un valor le fue asignado a cada genotipo, basándose en datos previamente publicados^{25,30}. La puntuación asignada a cada alelo *CYP2D6* se describe en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Puntuación asignada a cada alelo *CYP2D6* para la extrapolación de los fenotipos metabólicos

Alelo <i>CYP2D6</i>	Puntuación actividad
<i>CYP2D6</i> *3, *4, *4xN, *5, *6, *6xN	0
<i>CYP2D6</i> *10, *17, *29, *41	0.5
<i>CYP2D6</i> wt, *2, *35	1
<i>CYP2D6</i> (wt,*2,*35)xN	2 [^]

[^]En el caso de que N fuera mayor a 2, la puntuación sería igual a N. N = N° de veces que el alelo de *CYP2D6* está multiplicado y es mayor o igual a 2.

Los individuos cuyos genotipos *CYP2D6* fueron puntuados como 0, se agruparon en el grupo metabólico gPM *CYP2D6*; aquellos cuyos genotipos *CYP2D6* obtuvieron una puntuación mayor a 2 se agruparon como gUMs *CYP2D6*; el resto de los individuos se agruparon como gEMs *CYP2D6*.

La única excepción a la asignación de FEGs *CYP2D6* expuesta anteriormente se realizó para el Estudio X donde, debido a que el bajo número de sujetos con dos genes *CYP2D6* inactivos, se

agrupó como gPMs a los individuos cuyos genotipos *CYP2D6* fueron valorados como 0 y como 0.5.

3.4. Asignación del origen étnico de cada individuo

Todos los individuos que se incluyeron en los Estudios II, IV, V, VI, VII y VIII fueron interrogados sobre su ancestría, y la pertenencia o no a un grupo étnico fue autoasignada por los propios voluntarios. Los individuos con 4 abuelos de origen étnico caucásico europeo fueron asignados al grupo étnico caucásico. Del mismo modo, los que indicaron tener 4 abuelos africanos, amerindios o judíos Ashkenazi fueron asignados al grupo étnico africano, amerindio o judío Ashkenazi, respectivamente. Cualquier otra combinación fue asignada al grupo étnico no definido o mestizo.

Los estudios de variabilidad interétnica, principalmente el Estudio VII, han sido coordinados por el Consorcio CEIBA, dedicado al estudio de la variabilidad poblacional en Iberoamérica de enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos y que se engloba dentro de la red RIBEF. La metodología llevada a cabo en estos estudios se detalla en la publicación A7.3.

3.5. Medida de la capacidad hidroxiladora del *CYP2D6* a partir de la administración del fármaco test debrisoquina

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se utilizaron datos previamente publicados por el grupo de investigación en los que se medía la capacidad hidroxiladora de la enzima *CYP2D6*^{30,147}. A modo de resumen se expone la metodología que se realizó para determinar el fenotipo metabólico de los individuos.

Los sujetos ingirieron 10 mg de DBQ y tras un ayuno nocturno de unas 8 horas se recogió toda la orina. Los niveles del fármaco DBQ y de su metabolito 4-OHDBQ fueron medidos utilizando HPLC-UV. Como medida de la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* se estableció el MR a partir de dichas concentraciones tal como sigue:

$$MR_{DBQ} = \text{Concentración de la dosis excretada como DBQ} / \text{Concentración de la dosis excretada como 4OHDBQ}$$

Los individuos con MR_{DBQ} mayor o igual a 12.6 ($\log_{10} MR_{DBQ}$ mayor o igual a 1.1) se consideraron mPMs, y el resto mEMs. Dentro del grupo de los mEMs, aquellos individuos con un MR menor o igual a 0.1 fueron considerados mUMs.

3.6. Análisis cromatográfico de aripiprazol y su metabolito

En el Estudio III de la presente Tesis Doctoral se desarrolla un método cromatográfico HPLC con detección UV para cuantificar las concentraciones plasmáticas de ARI y DARI en pacientes psiquiátricos en tratamiento con aripiprazol.

3.6.1. Condiciones cromatográficas

Los analitos fueron separados con una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo, metanol y sulfato sódico (20 mM) y ácido acético (20:20:59:1) en modo de elución isocrático con un flujo de 1.5 mL/min. La columna cromatográfica se mantuvo a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 50 μ L. La fase móvil fue diariamente filtrada a través de filtros con un tamaño de poro de 0.22 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA) antes de su uso. La detección fue realizada a una longitud de onda de 254 nm. Bajo estas condiciones cromatográficas, ARI y DARI se separaron con un tiempo de análisis inferior a 16 min.

3.6.2. Preparación de las muestras

Una alícuota de 1 mL de plasma humano fue añadida a un tubo de polipropileno, al que se añadió 20 μ L de la solución de trabajo del IS. La solución final fue vortexada durante 10 s, tras lo cual se añadieron 250 μ L de hidróxido sódico (2 M) y 2 mL de dietil éter. Los tubos fueron agitados verticalmente durante 10 minutos y seguidamente centrifugados a 3500 rpm durante 15 min. La fracción orgánica fue transferida a un tubo limpio de polipropileno, donde se añadieron 200 μ L de ácido hidrocórico (2 M). Este tubo fue agitado durante 30 s y centrifugado a 3500 rpm durante 15 min. Entonces, la fracción orgánica fue eliminada y la acuosa se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno. El residuo fue reconstituido en 200 μ L de fase móvil, de donde se tomaron 50 μ L que fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

3.6.3. Validación del método analítico

Para evaluar la precisión, expresada como coeficiente de variación (CV), se llevaron a cabo tres inyecciones de plasma blanco al que se añadió soluciones estándar de ARI y DARI a concentraciones de 10, 200 y 500 ng/mL. El mismo procedimiento se repitió en días diferentes y por dos técnicos diferentes para determinar la precisión interdía.

El límite de detección, definido como la concentración de analito que da una señal equivalente a la señal blanco más tres veces su desviación estándar, fue calculado para cada analito. El límite de cuantificación, definido como la concentración de analito que da una señal equivalente a la señal blanco más diez veces su desviación estándar, fue también calculado para ARI y DARI.

Las curvas de calibración para calcular las concentraciones de ARI y DARI se representaron como cocientes de la altura máxima (ARI/IS o DARI/IS) frente a la concentración de cada analito. Así, para ARI y DARI 5 concentraciones diferentes que estuvieron entre 10 y 1000 ng/mL fueron testadas por triplicado.

La exactitud fue calculada como el índice entre las concentraciones medidas en las muestras plasmáticas tras la extracción y la concentración teórica, expresado en porcentaje. Este parámetro fue evaluado a tres concentraciones diferentes (10, 200 y 500 ng/mL) de ARI y DARI por triplicado.

La especificidad fue analizada por comparación de los tiempos de retención de diferentes fármacos puros con los tiempos de retención de ARI, DARI y prometazina. Estos fármacos incluyeron alprazolam, amitriptilina, maprotilina, carbamazepina, clorazepam, clorazepato, clorpromazina, clometizol, clomipramina, clotiapina, diazepam, fluoxetina, fluvoxamina, haloperidol, imipramina, levomepromazina, lorazepam, lormetazepam, midazolam, perazina, perfenazina, pimozida, prometazina, sulpirida, tioridazina, tioproperazina, trazodona, triazolam, trimipramina y zolpidem.

3.7. Evaluación del riesgo de desarrollar síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario

Para evaluar el riesgo de desarrollar síntomas relacionados con TCAs en las voluntarias sanas del Estudio VIII, se utilizó el Inventario de Trastornos de la Conducta Alimentaria (EDI, del inglés "Eating Disorder Inventory").

El EDI ^{173,174} es una de las medidas de auto-reporte más frecuentemente utilizadas para evaluar los TCAs, y ha mostrado buenas propiedades psicométricas en españoles ¹⁷⁵. Esta escala, relativamente breve, consta de 64 preguntas divididas en 8 sub-escalas que cubren diferentes síntomas relacionados con los TCAs:

- Obsesión por la delgadez (excesiva preocupación por la dieta y el peso, miedo a engordar).
- Bulimia (episodios de atracones de comida y purga).
- Insatisfacción corporal (no estar satisfecho con la apariencia física propia); Inoperancia (sentimientos de insuficiencia, inseguridad, inutilidad y pérdida de control de sus vidas).
- Perfeccionismo (búsqueda de estándares poco realistas); Desconfianza interpersonal (tendencia a rehuir relaciones interpersonales cercanas).

- Conciencia interoceptiva (incapacidad para discriminar sentimientos y entre sensaciones de hambre y saciedad).
- Temor a la madurez (miedo a enfrentarse a las exigencias de la vida madura).

Cada pregunta puede ser valorada de 0 a 3, y siempre la mayor puntuación se relaciona con mayor psicopatología. Los autores originales de la escala ^{173,174,176}, así como otros ^{177,178}, han utilizado diferentes puntos de corte en las tres primeras sub-escalas arriba mencionadas para medir los síntomas relacionados con TCAs y en la escala total para detectar el riesgo de sufrir un trastorno del comportamiento alimentario: igual o mayor a 14 ^{173,174,176}, 5 ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ y 16 ^{173,174,176} para las subescalas de “Obsesión por la delgadez”, “Bulimia” e “Insatisfacción corporal”, respectivamente, e igual o mayor a 43 para la puntuación “EDI-global” ¹⁷⁹.

3.8. Evaluación de la historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario

Como parte de una Entrevista Diagnóstica, a los pacientes incluidos en el Estudio IX se les preguntó: “¿Has intentado alguna vez en tu vida suicidarte?”. Un intento suicida fue definido como un acto de auto-destrucción con la intención, en mayor o menor medida, de terminar con la propia vida. Así, para ser considerado como intento suicida se requirió que 1) el intento fuera una acción de auto-destrucción y 2) un reconocimiento de la intención de morir.

3.9. Evaluación de la discontinuación del tratamiento antidepresivo en pacientes diagnosticados con depresión mayor

La discontinuación del tratamiento antidepresivo en el Estudio X se definió como el abandono del tratamiento antidepresivo por parte del paciente, y fue evaluada en las semanas 4, 8 y 12 del tratamiento.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el Estudio II, una prueba U de Mann-Whitney se usó para comparar los MR de DBQ entre los dos grupos genotípicos de *CYP2D6* -1584C>G (GG más GC, frente a CC), y el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar los diferentes grupos genotípicos *CYP2D6* -1584C>G en total. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los

análisis estadísticos se llevaron a cabo en el GraphPad Prism® 5.00 (GraphPad Software. Inc., CA, USA).

En el Estudio III, una prueba t de Student se utilizó para comparar los MR de ARI entre los diferentes grupos de pacientes (con o sin inhibidores de CYP2D6, con uno o dos genes activos CYP2D6)

El equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias de CYP2D6 en las diferentes poblaciones de estudio fue determinado mediante la comparación de las frecuencias genotípicas CYP2D6 observadas y esperadas usando una tabla de contingencia X² con corrección de Yates, con el software GraphPad Prism® 5.00 (GraphPad Software. Inc., CA, USA).

Las frecuencias alélicas y genotípicas CYP2D6 entre los diferentes grupos del Estudio IV fueron comparadas mediante el test exacto de Fisher.

El test X² fue utilizado para comparar 1) las mujeres con riesgo de desarrollar síntomas relacionados con los TCAs frente a no riesgo entre los diferentes grupos funcionales evaluados con DBQ (mPM, mEM, mUM) o el número de genes CYP2D6 activos (0, 1, 2 o >2) en el Estudio VIII; 2) la relación entre el número de genes CYP2D6 activos y la historia frente a no historia de tentativa suicida en la población total de pacientes con TCAs, así como en la subpoblación de pacientes diagnosticados con bulimia nerviosa – purgativa en el Estudio IX; y 3) la discontinuación del tratamiento antidepresivo entre los diferentes grupos genotípicos CYP2D6 en el Estudio X.

Además, un análisis de regresión logística binaria se utilizó para testar el intento suicida como una variable dependiente y el número de genes activos CYP2D6 como una independiente en el Estudio IX.

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los voluntarios sanos y pacientes que han colaborado en los estudios de la presente Tesis Doctoral fueron informados de cada uno de los estudios verbalmente y por escrito, y firmaron un consentimiento informado previamente a su participación en los mismos.

Los Comités de Ética locales de cada país implicado en algunos de los estudios de la presente Tesis Doctoral aprobaron los estudios que se exponen. Igualmente, el Proyecto de Tesis

Doctoral fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España) y por Comité de Ética del Hospital Universitario “Infanta Cristina” de Extremadura.

Todos los estudios de la presente Tesis Doctoral fueron realizados de acuerdo a las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, Junio de 1964), revisada por última vez por la 64ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Fortaleza, Brasil, Octubre de 2013).

IV. RESULTADOS

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.	73
Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4.....	73
BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	78
Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México	78
Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de España.....	79
Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal.....	83
Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas	83
BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	85
Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba	85
Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México	86
Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México	87

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido, en su mayoría, publicados previamente. Los detalles específicos de cada estudio pueden consultarse en las publicaciones A1 – A10.

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.

Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4

El cóctel de fenotipación que se propone, llamado “cóctel CEIBA” (Tabla IX), permite medir la capacidad metabólica de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 mediante la selección de los siguientes fármacos test: cafeína (100 mg) para CYP1A2, losartán (25 mg) para CYP2C9, omeprazol (25 mg) para CYP2C19 y dextrometorfano (30 mg) para la evaluación simultánea de CYP2D6 y CYP3A4.

Tabla IX. Descripción de los fármacos test, dosis y tiempo de recogida de la muestra de plasma propuestos en el cóctel CEIBA para la medida de la capacidad hidroxiladora de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4

FÁRMACO TEST	DOSIS ADMINISTRADA (mg)	TIEMPO DE RECOGIDA DE LA MUESTRA (horas)	ENZIMA CYP
Cafeína	100	2	1A2
Losartán	25	2	2C9
Omeprazol	25	2	2C19
Dextrometorfano	30	3	2D6; 3A4

Estudio II. Estudio de la influencia del polimorfismo del promotor *CYP2D6* -1584C>G en la capacidad metabólica de *CYP2D6*

La influencia del polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G en los índices metabólicos de DBQ entre los 320 voluntarios sanos estudiados se muestra en la Figura 4.

Entre los individuos portadores de uno o dos genes activos *CYP2D6*, el MR (\log_{10} media \pm desviación estándar) de los sujetos con el alelo *CYP2D6* -1584G fue más bajo (-0.13 ± 0.33 y -0.32 ± 0.39 , respectivamente) que el de los individuos con el alelo *CYP2D6* -1584C (0.17 ± 0.52 y -0.20 ± 0.44 , respectivamente; $p < 0.05$).

Entre los individuos con más de dos genes activos *CYP2D6* (gUMs), el MR de los portadores del alelo *CYP2D6* -1584G fue más bajo que el los sujetos que no lo portaban (-0.85 ± 0.69 y -0.59 ± 0.40 , respectivamente), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Ninguno de los gPMs (individuos sin ningún gen *CYP2D6* activo) portaba el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G.

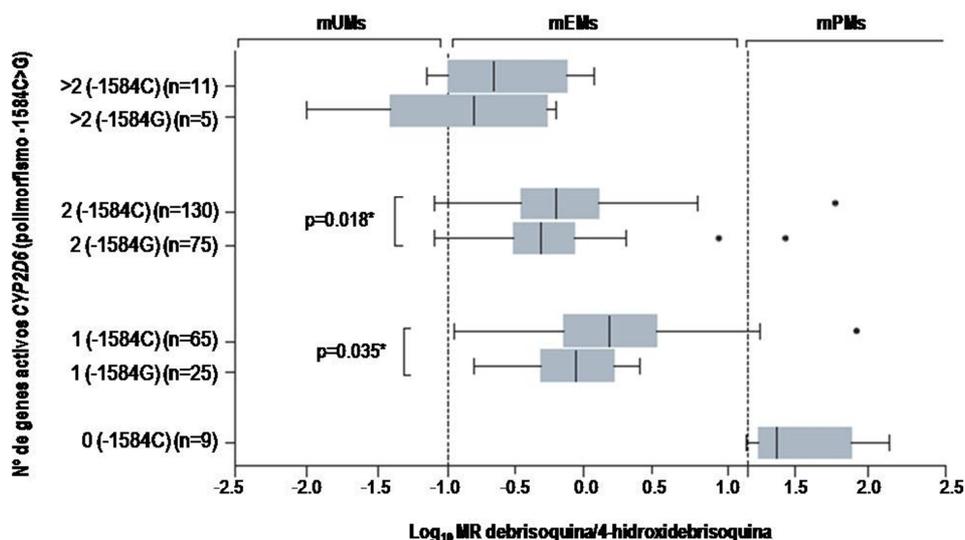


Figura 4. Influencia del polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G en los índices metabólicos de debrisoquina en los 320 voluntarios sanos estudiados. Los diferentes genotipos se han codificado de acuerdo al número de genes *CYP2D6* activos: 0 (portadores de dos alelos sin actividad *CYP2D6**3, *4, *5 o *6), 1 (portadores de un alelo activo y uno no activo), 2 (portadores de dos alelos activos *CYP2D6**1, *2, *10 o *17) y >2 (portadores de más de dos genes *CYP2D6* activos). La tendencia entre todos los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$; análisis Kruskal-Wallis del test de la varianza). Los diagramas de caja muestran la mediana (líneas negras), los rangos intercuartiles (cajas grises) y los valores atípicos (valores mayores al percentil 99 basándose en el diagrama de cajas de Tukey; puntos negros). n = n° de individuos. MR = índice metabólico. mUMs = metabolizadores ultrarrápidos. mEMs = metabolizadores rápidos. mPMs = metabolizadores lentos. Tomada de la publicación A2.

Estudio III. Estudio de la relevancia del genotipo *CYP2D6* y las interacciones farmacológicas en el índice metabólico de aripiprazol

Para la detección y análisis del fármaco ARI y su principal metabolito DARI se ha desarrollado y validado un nuevo método de HPLC con detección ultravioleta. La Figura 5 muestra los cromatogramas obtenidos de una muestra de plasma blanco humano (A), una muestra de plasma blanco humano enriquecida con 14.6 μ /mL de prometazina, 200 ng/mL de aripiprazol y 200 ng/mL de dehidroaripiprazol (B) y una muestra de plasma extraída de un paciente que recibía 10 mg/día de aripiprazol (C).

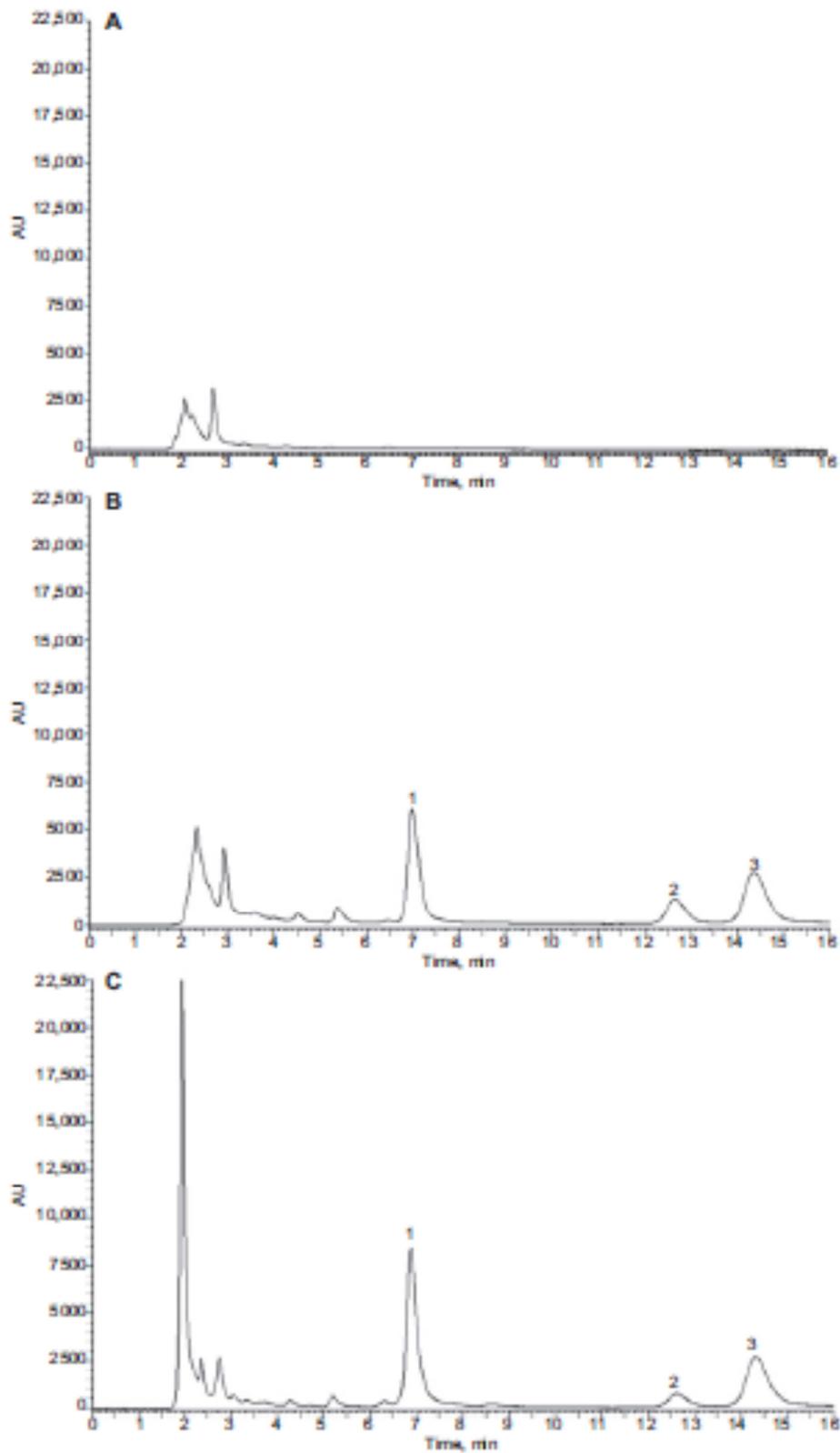


Figura 5. Cromatogramas obtenidos de una muestra de plasma blanco humano (A), una muestra de plasma blanco humano enriquecida con 14.6 µ/mL de prometazina, 200 ng/mL de aripiprazol y 200 ng/mL de dehidroaripiprazol (B) y una muestra de plasma extraída de un paciente que recibía 10 mg/día de aripiprazol (C). Picos: prometazina (1), aripiprazol (2) y dehidroaripiprazol (3). Tomado de la publicación A3.1.

Las características completas del método pueden consultarse en la publicación A3.1. Los tiempos de retención medios (media±DS; n=10) fueron de 6.96±0.17 para la prometazina (estándar interno), 12.7±0.5 para aripiprazol y 14.5±0.6 para dehidroaripiprazol. La regresión lineal fue demostrada dentro del intervalo de concentraciones de 2 a 1000 mg/mL. Los coeficientes de correlación para ambos analitos fueron superiores al 0.999.

Los límites de detección obtenidos fueron de 0.38 ng/mL y 0.44 ng/mL para ARI y DARI, respectivamente. Además el límite de cuantificación fue de 1.0 ng/mL para ARI y de 0.78 para DARI. La media del porcentaje de exactitud para las concentraciones 10, 200 y 500 ng/mL fueron de 104% para ARI y de 97% para DARI, y los porcentajes del coeficiente de variación intra e interdía fueron menores del 10.4% para todos los analitos (Tabla X).

Tabla X. Exactitud y precisión del método de cuantificación de aripiprazol y dehidroaripiprazol.

	Concentración teórica, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	Exactitud (%; n=9)	Precisión (%; n=9)	
				Intradía	Interdía
Aripiprazol	10	10.2	102	10.40	9.50
	200	207	104	2.96	5.10
	500	530	106	1.55	3.34
Dehidroaripiprazol	10	8.2	82	3.94	9.30
	200	211	106	3.07	5.36
	500	513	103	2.02	3.76

n = nº de individuos

El método desarrollado fue utilizado para medir las concentraciones plasmáticas de ARI y DARI en 22 pacientes psiquiátricos en tratamiento con ARI. Las concentraciones de ARI y DARI variaron en un rango de 2 – 189 ng/mL y 11 – 359 ng/mL, respectivamente (Figura 6).

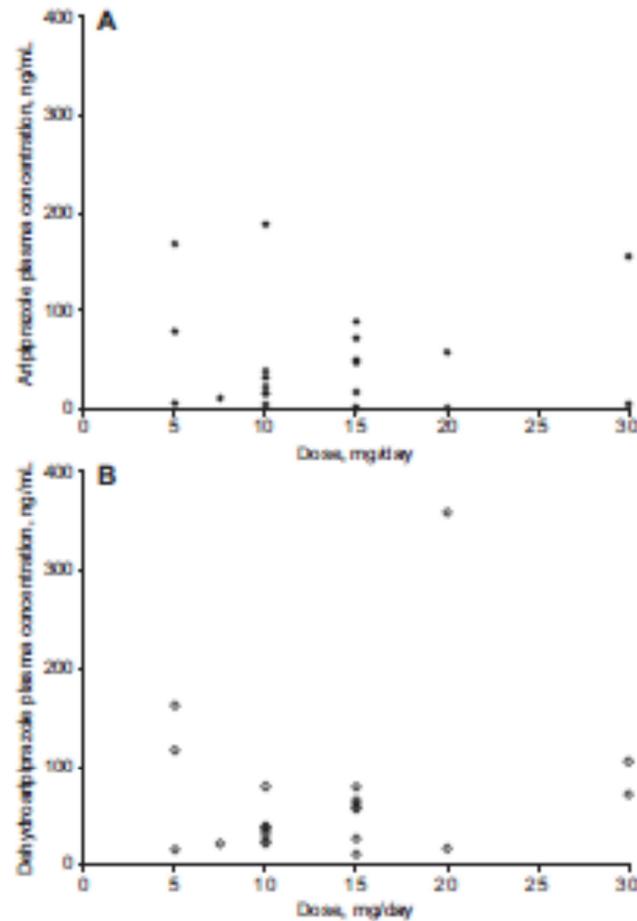


Figura 6. Concentraciones plasmáticas en ng/mL de aripiprazol (A) y dehidroaripiprazol (B) en los 22 pacientes tratados con diferentes dosis de aripiprazol. Tomado de la publicación A3.1.

El MR ARI/ARI fue calculado en los 22 pacientes, que fueron estratificados en cuatro subgrupos, de acuerdo al número de genes activos *CYP2D6* y al tratamiento concomitante con inhibidores *CYP2D6*:

- 7 y 5 pacientes con uno y dos genes activos *CYP2D6*, respectivamente, y sin tratamiento con inhibidores *CYP2D6*.
- 3 y 7 pacientes con uno y dos genes activos *CYP2D6*, respectivamente, y en tratamiento con inhibidores *CYP2D6*.

La media (\pm desviación estándar) del MR ARI/DARI en el grupo de pacientes con un gen activo *CYP2D6* en tratamiento con inhibidores *CYP2D6* (2.96 ± 2.75) fue más alto que en el grupo con uno (0.50 ± 0.38 ; $p < 0.05$) y dos (0.66 ± 0.68 ; $p < 0.05$) genes activos sin tratamiento con inhibidores, y en pacientes con dos genes activos en tratamiento con inhibidores (0.58 ± 0.38 ; $p <$

0.05). Además, no se encontraron diferencias significativas en las medias del MR ARI/DARI entre los dos subgrupos sin tratamiento con inhibidores CYP2D6 (Figura 7).

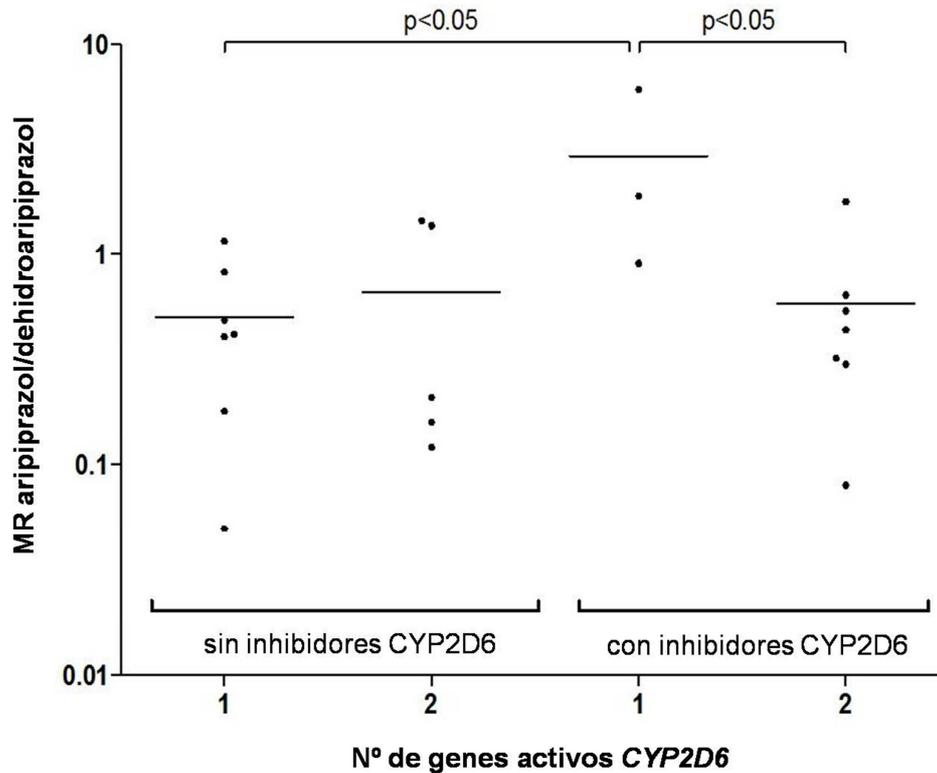


Figura 7. MR de aripiprazol/dehidroaripiprazol en un panel de pacientes tratados con aripiprazol. Los pacientes fueron estratificados según el número de genes activos *CYP2D6* y el tratamiento concomitante con inhibidores *CYP2D6*. Tomado de la publicación A3.2.

BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6

Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México

Las frecuencias alélicas de estas poblaciones estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. A modo de resumen, las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs de *CYP2D6* se muestran en la Tabla XI. Para conocer el resto de frecuencias consultar la publicación A4.

La multiplicación de genes activos *CYP2D6* estuvo presente en todos los grupos amerindios estudiados, con frecuencias que variaron desde 0.043 en el grupo Cora hasta el 0.107 del grupo Huichol (Tabla XI).

Tabla XI. Descripción de las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y gUMs en los ocho grupos amerindios de México.

Grupo étnico	n	Multiplicación de genes activos <i>CYP2D6</i> (%)	gUMs (%)
Mexicanero	39	7.69	15.38
Seri	19	5.26	10.52
Guarijío	15	10	20
Tepehuano	129	5.43	5.39
Mayo	44	9.09	18.18*
Huichol	107	10.74	20.56*
Tarahumara	74	6.76	12.15
Cora	81	4.32	8.64

* $p < 0.05$ entre el grupo Huichol y los grupos Tepehuano y Cora y de Mexicanos Mestizos; y entre el grupo Mayo y el grupo Tepehuano.

La frecuencia de gUMs *CYP2D6* en los grupos amerindios estudiados varió desde el 5.39% del grupo Tarahumara al 20.56% del grupo Huichol (Tabla XI), y esta frecuencia fue mayor en los grupos nativos americanos (a excepción del grupo Tepehuano) que en los mestizos mexicanos (7% de gUMs), pero solo el grupo Huichol mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$). Entre los grupos amerindios estudiados, la frecuencia de gUMs de *CYP2D6* fue significativamente mayor en los Huicholes que en los grupos Tepehuano y Cora, y que en los mestizos mexicanos ($p < 0.05$), así como mayor en el grupo Mayo que en el Tepehuano ($p < 0.05$). (Tabla XI). Cuando se tomaron todos los grupos Amerindios como uno y se compararon con los mexicanos mestizos, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de gUMs.

Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de España

Las variantes alélicas de *CYP2D6* fueron estudiadas en 805 voluntarios sanos de España. La Tabla XII muestra las frecuencias de alelos *CYP2D6* en la población estudiada. Los genotipos

CYP2D6 y los grupos FEGs en la población española estudiada se muestran en las Tablas XIIIa y XIIIb.

Tabla XII. Descripción de las frecuencias de alelos CYP2D6 estudiados en una población de 805 voluntarios sanos de España.

Alelo de CYP2D6	n	%
<i>wt</i>	645	40.06
*2	273	16.96
*3	22	1.37
*4	298	18.51
*4M	8	0.50
*5	26	1.61
*6	14	0.87
*10	35	2.17
*17	15	0.93
*29	0	0.00
*35	85	5.28
*41	121	7.52
(*1, *2 o *35)xN	59	3.66
*4xN	6	0.37
*41xN	3	0.19

n = número de alelos

La frecuencia de genes activos CYP2D6 multiplicados fue de 3.66%. Además, se describieron multiplicaciones en los alelos CYP2D6*4xN (0.37%) y *41 (0.19%). El alelo sin actividad más abundante fue CYP2D6*4 (19.01%), seguido de *5 (1.61%), *3 (1.37%) y *6 (0.87%). De los alelos con actividad disminuida estudiados, CYP2D6*41 fue el más abundante (7.52%). Los alelos de actividad normal CYP2D6*2 y *35 tuvieron una frecuencia de 18.51% y 5.28%, respectivamente. En relación a los grupos metabólicos de CYP2D6, La frecuencia de gUMs fue de 5.34%, mientras que la de gPMs fue de 5.21% (Tabla XIIIa y XIIIb).

Tabla XIIIa. Descripción de las frecuencias de los genotipos *CYP2D6* obtenidos en una muestra de 805 voluntarios sanos de España.

Grupo metabólico <i>CYP2D6</i>	Puntuación de actividad	Genotipo <i>CYP2D6</i>		
			n	%
gPM	0	*3/*4	4	0.50
	0	*4/*4	27	3.35
	0	*4/*4M	3	0.37
	0	*4M/*4M	1	0.12
	0	*4/*5	4	0.50
	0	*4/*6	3	0.37
gEM	0.5	*3/*41	1	0.12
	0.5	*4/*10	10	1.24
	0.5	*4/*17	3	0.37
	0.5	*4/*41	23	2.86
	0.5	*5/*41	2	0.25
	0.5	*6/*41	1	0.12
	0.5	*4x2/*41	1	0.12
	0.5	*4x2/*17	1	0.12
	1	wt/*3	13	1.61
	1	wt/*4	117	14.53
	1	wt/*4xN	2	0.25
	1	wt/*5	12	1.49
	1	wt/*6	7	0.87
	1	*2/*3	4	0.50
	1	*2/*4	46	5.71
	1	*2/*4M	2	0.25
	1	*2/*5	5	0.62
	1	*2/*6	2	0.25
	1	*4/*35	17	2.11
	1	*5/*35	2	0.25
	1	*6/*35	1	0.12
	1	*10/*10	1	0.12
	1	*10/*41	3	0.37
	1	*17/*41	1	0.12
	1	*41/*41	9	1.12
	1	*2/*4x2	1	0.12
1	*4x2/*41x2	1	0.12	

n = número de individuos. N ≥ 2.

IV. Resultados

Tabla XIIIb. Descripción de las frecuencias de los genotipos *CYP2D6* obtenidos en una muestra de 805 voluntarios sanos de España.

Grupo metabólico <i>CYP2D6</i>	Puntuación de actividad	Genotipo <i>CYP2D6</i>		
			n	%
gEMs	1.5	<i>wt/*10</i>	14	1.74
	1.5	<i>wt/*17</i>	6	0.75
	1.5	<i>wt/*41</i>	41	5.09
	1.5	<i>*2/*10</i>	4	0.50
	1.5	<i>*2/*17</i>	2	0.25
	1.5	<i>*2/*41</i>	19	2.36
	1.5	<i>*17/*35</i>	2	0.25
	1.5	<i>*35/*41</i>	5	0.62
	1.5	<i>*41/*41x2</i>	2	0.25
	2	<i>wt/wt</i>	135	16.77
	2	<i>wt/*2</i>	111	13.79
	2	<i>wt/*35</i>	31	3.85
	2	<i>*2/*2</i>	29	3.60
	2	<i>*2/*35</i>	12	1.49
	2	<i>*35/*35</i>	3	0.37
	2	<i>wtx2/*4</i>	2	0.25
	2	<i>*2x2/*4</i>	11	1.37
	2	<i>*2x2/*4M</i>	1	0.12
	2	<i>*2x2/*5</i>	1	0.12
	2	<i>*4/*35x2</i>	1	0.12
gUM	2.5	<i>wtx2/*41</i>	1	0.12
	2.5	<i>*2xN/*10</i>	2	0.25
	2.5	<i>*2xN/*41</i>	3	0.37
	3	<i>wt/wtxN</i>	6	0.75
	3	<i>wt/*2xN</i>	15	1.86
	3	<i>wtxN/*35</i>	1	0.12
	3	<i>*2/*2xN</i>	7	0.87
	3	<i>*2xN/*35</i>	7	0.87
	3	<i>*35x2/*35</i>	1	0.12

n = número de individuos. N ≥ 2.

Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal

La Tabla XIV muestra las frecuencias alélicas de *CYP2D6* encontradas en una población de Portugal. Todas las frecuencias alélicas estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, con excepción de las variantes *CYP2D6*10* y *CYP2D6*17*, posiblemente debido a la escasez de estas variantes en la población estudiada.

La frecuencia de los genes activos *CYP2D6* multiplicados fue de 3.0% en esta población de voluntarios sanos de Portugal y se detectó el alelo *CYP2D6*10xN* con una frecuencia del 0.2%. El alelo más frecuente fue el *CYP2D6 wt* (37.67%), seguido de *2 (33.33%) y el *4 (18.17%).

Tabla XIV. Descripción de las frecuencias de alelos *CYP2D6* estudiados en una población de 300 voluntarios sanos de Portugal.

Alelo de <i>CYP2D6</i>	n	%
<i>wt</i>	226	37.67
*2	200	33.33
*3	3	0.50
*4	109	18.17
*5	15	2.50
*6	1	0.20
*10	21	3.50
*17	6	1.00
(*1, *2 o *35)xN	18	3.00
*10xN	1	0.20

n = número de alelos

En cuanto a los grupos metabólicos de *CYP2D6*, el porcentaje de gUMs de esta población fue de 4.7%, mientras que el de gPMs fue de 6.3%.

Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas

La Tabla XV muestra las frecuencias alélicas de *CYP2D6* en poblaciones iberoamericanas con origen étnico amerindio (n=1363), caucásico (n=1506), africano (n=83), judío Ashkenazi (n=173) y no definido (mestizo; n=2102). La frecuencia de genes activos *CYP2D6* multiplicados fue de 3.89%, 3.52%, 6.02%, 6.36% y 3.78% en las poblaciones amerindia, caucásica, africana, judía Ashkenazi y de origen ancestral no definido (mestiza), respectivamente.

Por otro lado, la Tabla XVI muestra las frecuencias de los diferentes fenotipos metabólicos CYP2D6 en poblaciones lberoamericanas con origen étnico amerindio, caucásico, africano, judío Ashkenazi y no definido (mestizo). Las frecuencias de gUMs fueron de 7.26%, 5.38%, 8.43%, 11.56% y 6.57% en las poblaciones amerindia, caucásica, africana, judía Ashkenazi y de origen ancestral no definido (mestiza), respectivamente.

Tabla XV. Descripción de las frecuencias alélicas CYP2D6 en poblaciones de voluntarios sanos nativas americanas (amerindias), caucásicas, africanas, de judíos y de origen étnico no definido (mestiza) de Iberoamérica.

Alelo de CYP2D6	Amerindios		Caucásicos		Africanos		Judíos Ashkenazi		Mestizos	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
wt	1735	63.65	1228	40.77	72	43.37	126	36.42	2119	50.40
*2	564	20.69	522	17.33	16	9.64	44	12.72	816	19.41
*3	0	0.00	29	0.96	1	0.60	4	1.16	16	0.38
*4	216	7.92	533	17.7	10	6.02	62	17.92	502	11.94
*5	49	1.80	57	1.89	6	3.61	4	1.16	103	2.45
*6	3	0.11	19	0.63	0	0	1	0.29	17	0.50
*10	8	0.29	55	1.83	4	2.41	11	3.18	62	1.47
*17	9	0.33	38	1.26	26	15.66	2	0.58	69	1.64
*29	3	0.11	4	0.13	12	7.23	0	0	36	0.86
*35	5	0.18	149	4.95	1	0.60	9	2.60	102	2.43
*41	25	0.92	258	8.57	3	1.81	56	16.18	184	4.38
(wt,*2 o *35)xN	106	3.89	106	3.52	10	6.02	22	6.36	159	3.78
*4xN	3	0.11	8	0.27	2	1.21	3	0.87	17	0.40
*6xN	1735	63.65	1	0.03	0	0	0	0	0	0
*10xN	564	20.69	0	0	2	1.21	1	0.29	1	0.02
*17xN	0	0.00	0	0	1	0.60	0	0	0	0
*41xN	216	7.92	5	0.17	0	0	1	0.29	1	0.02

n = nº de alelos. N ≥ 2.

Tabla XVI. Descripción de las frecuencias de los diferentes fenotipos metabólicos estimados a partir de los datos de genotipo CYP2D6 en poblaciones de voluntarios sanos nativas americanas (amerindias), caucásicas, africanas, de judíos Ashkenazi y de origen étnico no definido (mestiza) de Iberoamérica.

Fenotipo metabólico CYP2D6	Puntuación de actividad	Amerindios (n _{total} =1363)		Caucásicos (n _{total} =1506)		Africanos (n _{total} =83)		Judíos Ashkenazi (n _{total} =173)		Mestizos (n _{total} =2102)	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
gPM	0	23	1.69	70	4.65	2	2.41	9	5.20	48	2.28
	0.5	8	0.59	82	5.44	5	6.02	15	8.67	55	2.62
gEM	1	210	15.41	427	28.35	14	16.87	43	24.86	502	23.88
	1.5	34	2.49	205	13.61	25	30.12	36	20.81	224	10.66
gUM	2	989	72.56	641	42.56	30	36.15	50	28.90	1135	54.00
	>2	99	7.26	81	5.38	7	8.43	20	11.56	138	6.57

n = nº de individuos.

BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6

Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba

Las puntuaciones medias de la población estudiada en cada una de las secciones del cuestionario “EDI-global”, “EDI-obsesión por la delgadez”, “EDI-bulimia” y “EDI- insatisfacción corporal” pueden consultarse en la publicación A8.

Todas las mujeres tuvieron puntuaciones de no riesgo en el “EDI-global”, “EDI-obsesión por la delgadez” o “EDI- insatisfacción corporal”. Sin embargo, a pesar de que las puntuaciones máximas de “EDI-bulimia” fueron bajas, el 47.7% de las mujeres presentaron puntuaciones de riesgo (5 o 6), lo cual es indicativo de atracones y purga o de pérdida de control sobre la comida.

Las frecuencias alélicas *CYP2D6* en la población estudiada de mujeres sanas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. El porcentaje de mujeres gPMs *CYP2D6* fue de 4.4%, mientras que los porcentajes en mujeres portadores de uno, dos genes activos *CYP2D6* y de gUMs *CYP2D6* fue de 22.6%, 65.4% y 7.6%, respectivamente. Con respecto a la frecuencia de los grupos metabólicos mPM y mUM medidos con DBQ, el porcentaje de mPMs fue de 4.4%, similar al de mujeres sin genes activos *CYP2D6*; sin embargo, la frecuencia de mujeres mUMs fue de 5.7%, y solo incluyó al 44% de las mujeres gUMs.

La Tabla XVII muestra la frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo a la capacidad hidroxiladora *CYP2D6* y la puntuación de “EDI-bulimia” en riesgo (≥ 5) frente a no riesgo. El grupo de riesgo en la escala de “EDI-bulimia” (puntuación ≥ 5 ; $n=77$) frente al grupo de no riesgo (puntuación < 5 ; $n=82$) presentó una distribución diferente, con un mayor número de mujeres mUMs *CYP2D6* y un menor número de mPMs ($p < 0.01$).

Tabla XVII. Frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo al fenotipo metabólico de debrisoquina (MR>12.6 = mPMs; MR≤12.6 y MR≥0.1 = mEMs; MR<0.1 = mUMs) y a las puntuaciones en “EDI-bulimia” de riesgo (≥5) frente a no riesgo.

	mPMs CYP2D6 n (% ± IC 95%)	mEMs CYP2D6 n (% ± IC 95%)	mUMs CYP2D6 n (% ± IC 95%)
EDI-Bulimia (<5; n=82)*	6 (7.3; 3.1-15.3)	75 (91.5; 83.1-96.1)	1 (1.2; 0.0-7.2)
EDI-Bulimia (≥5; n=77)	1 (1.3; 0.0-7.7)	68 (88.3; 79.0-93.9)	8 (10.4; 5.1-19.4)

mPMs = Metabolizadores lentos medidos a través de la administración de debrisoquina. mEMs = Metabolizadores rápidos medidos a través de la administración de debrisoquina. mUMs = Metabolizadores ultrarrápidos medidos a través de la administración de debrisoquina. n = número de individuos. *p < 0.01 usando un test de Chi cuadrado. IC = intervalos de confianza para cada porcentaje.

La Tabla XVIII muestra la frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo al número de genes activos *CYP2D6* y la puntuación de “EDI-bulimia” en riesgo (≥5) versus sin riesgo. La distribución de acuerdo al número de genes activos (uno, dos o más de dos) mostró el mismo patrón con respecto a las mujeres gPMs, pero el número de mujeres portadores de genes activos fue similar en ambos grupos. Como se mencionó anteriormente, solo 4 de las 9 mujeres gUMs *CYP2D6* fueron además mUMs.

Tabla XVIII. Frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo al número de alelos activos *CYP2D6* y a las puntuaciones en “EDI-bulimia” de riesgo (≥5) frente a no riesgo.

	CYP2D6 = 0 n (% ± IC 95%)	CYP2D6 = 1 n (% ± IC 95%)	CYP2D6 = 2 n (% ± IC 95%)	CYP2D6 > 2 n (% ± IC 95%)
EDI-Bulimia (<5; n=82)	6 (7.3; 3.1-15.3)	19 (23.2; 15.3-33.5)	51 (62.2; 51.4-71.9)	6 (7.3; 3.1-15.3)
EDI-Bulimia (≥5; n=77)	1 (1.3; 0.0-7.7)	17 (22.1; 14.2-32.6)	53 (68.8; 57.8-78.1)	6 (7.8; 3.3-16.3)

n = número de individuos. IC = intervalos de confianza para cada porcentaje.

Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido *CYP2D6* e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México

La Tabla XIX muestra la prevalencia de intentos suicidas en función del número de genes activos *CYP2D6* en la población total de pacientes con TCAs y en una subpoblación diagnosticada con bulimia nerviosa purgativa.

En la población total con TCAs, las frecuencias de gUMs *CYP2D6* y de gPMs *CYP2D6* fueron de 9.3 y 2.5%, respectivamente. Sin embargo, estas frecuencias se incrementaron y disminuyeron

respectivamente entre aquellos sujetos que habían intentado suicidarse (gUMs = 21.4%; gPMs = 0%), aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los grupos metabólicos de CYP2D6 y la historia de tentativa suicida en la población total de pacientes con TCAs estudiados.

Por el contrario, la relación entre el genotipo CYP2D6 y la historia de tentativa suicida fue estadísticamente significativa en una subpoblación de pacientes diagnosticados con bulimia nerviosa purgativa (Tabla XIX).

Tabla XIX. Alelos activos CYP2D6 e historia de intentos suicidas en una población de pacientes con TCAs (n =204) y una subpoblación de esta con diagnóstico de bulimia nerviosa purgativa (n = 80).

	CYP2D6 =0	CYP2D6 = 1	CYP2D6 = 2	CYP2D6 > 2
TCAs (n=204)	5 (2.5%)	50 (24.5%)	130 (63.7%)	19 (9.3%)
Intentos suicidas (n=14; 6.9%)	0 (0%)	3 (21.4%)	8 (57.1%)	3 (21.4%)
No intentos suicidas (n=190; 93.1%)	5 (2.6%)	47 (24.7%)	122 (64.2%)	16 (8.4%)
BN-P (n=80)*	2 (2.5%)	22 (27.5%)	47 (58.8%)	9 (11.3%)
Intentos suicidas (n=9; 11.3%)	0 (0%)	1 (11.1%)	5 (55.6%)	3 (33.3%)
No intentos suicidas (n=71; 88.8%)	2 (2.8%)	21 (29.6%)	42 (59.2%)	6 (8.5%)

n = número de individuos. * p < 0.05 usando un test de Chi cuadrado.

Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México

La Tabla XX muestra la frecuencia de pacientes clasificados de acuerdo al genotipo CYP2D6 y el abandono del tratamiento a los 28 días en monoterapia con fármacos antidepresivos fluoxetina o amitriptilina frente al no abandono del tratamiento en pacientes con trastorno depresivo mayor de México.

Hubo diferencias en el índice de abandono del tratamiento antidepresivo a las cuatro semanas entre los grupos metabólicos extrapolados de CYP2D6 (p < 0.01). En general, los porcentajes de

IV. Resultados

discontinuación del tratamiento antidepresivo fueron de 25, 36 y 46% en las semanas 4, 8 y 12, respectivamente. Ningún paciente regresó a la consulta para recibir el tratamiento una vez que lo hubo dejado. Todos los gUMs CYP2D6 abandonaron el tratamiento en las 4 primeras semanas, mientras que ningún gPM CYP2D6 abandonó el tratamiento en las 12 semanas de seguimiento.

Tabla XX. Tasas de discontinuación del tratamiento antidepresivo monoterapéutico de fluoxetina o amitriptilina con respecto a diferentes fenotipos metabólicos y puntuaciones de actividad del genotipo *CYP2D6*.

Discontinuación (en la semana 4 / día 28)	gPM CYP2D6 (0+0.5)	gEM CYP2D6 (1)	gEM CYP2D6 (1.5+2)	gUM CYP2D6 (>2)
	n = 4 (%)	n = 18 (%)	n = 74 (%)	n = 4 (%)
Sí (n = 26)	0 (0%)	2 (11,1%)	20 (27%)	4 (100%)
No (n = 74)	4 (100%)	16 (88.9%)	54 (73%)	0 (0%)

n = número de individuos.

V. DISCUSIÓN

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.	91
Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4.....	91
BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	98
Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México	98
Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de España.....	99
Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Portugal.....	102
Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas	103
BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6	106
Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba	106
Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México	108
Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México	110
DISCUSIÓN GENERAL	111

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO DE LA ENZIMA CYP2D6.

Estudio I. Propuesta de un cóctel de fenotipación para medir la capacidad metabólica de las enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4

El cóctel de fenotipación propuesto podría utilizarse para medir la capacidad hidroxiladora de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 mediante la administración simultánea de cafeína (CYP1A2), losartán (CYP2C9), omeprazol (CYP2C19) y dextrometorfano (CYP2D6 y CYP3A4). De esta manera, se podrían identificar individuos con una capacidad metabólica incrementada en varias enzimas CYP, lo cual puede tener implicaciones clínicas importantes ¹⁸⁰.

La elección de los fármacos test es un punto muy importante a la hora de generar una propuesta de cóctel de fenotipación. El fármaco test debe estar disponible actualmente en el mercado, con un rango de seguridad muy amplio, es decir, que no genere efectos adversos en los voluntarios, y además, se deben evitar las interacciones fármaco-fármaco, así como la inhibición de las enzimas por parte de los mismos.

Han sido propuestos varios cócteles de fenotipación para medir el fenotipo metabólico de las enzimas CYP (Tabla XXI), aunque solo algunos de ellos permiten medir simultáneamente la capacidad de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 ^{68,162,163,181-187}.

Tabla XXI. Cócteles de fenotipación propuestos, incluyendo el cóctel CEIBA, para medir la capacidad hidroxiladora de diferentes enzimas CYP (sigue en las páginas 92 y 93).

PRIMER AUTOR (REFERENCIA)	FÁRMACOS TEST	ENZIMAS CYP
Frye y cols. ⁶⁴	Cafeína	1A2
	Mefenitoína	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Dapsona	3A; NAT2
Scott y cols. ¹⁶³	Cafeína	1A2
	Diclofenaco	2C9
	Mefenitoína	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Midazolam	3A4
Streetman y cols. ⁶⁵	Cafeína	1A2; NAT2; XO
	Omeprazol	2C19
	Dextrometorfano	2D6
	Midazolam	3A

PRIMER AUTOR (REFERENCIA)	FÁRMACOS TEST	ENZIMAS CYP
Zhu y cols. ¹⁸⁸	Cafeína	1A2
	Mefenitoína	2C19
	Metoprolol	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Midazolam	3A
Blakey y cols. ⁶⁶	Cafeína	1A2
	Tolbutamida	3A4
	Debrisoquina	2C9
	Clorzoxazona	2D6
	Midazolam	2E1
Christensen y cols. ¹⁶²	Cafeína	1A2
	Losartán	2C9
	Omeprazol	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Quinina	3A4
Chainuvati y cols. ¹⁸¹	Cafeína	1A2; NAT2; XO
	Dextrometorfano	2D6
	Omeprazol	2C19
	Midazolam	3A Hepático
	S-Warfarina + vit. K	2C9
Yin y cols. ¹⁸²	Cafeína	1A2
	Tolbutamida	2C9
	Omeprazol	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Midazolam	3A
Sharma y cols. ¹⁸⁹	Cafeína	1A2; NAT2; XO
	Metoprolol	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Tolbutamida	2C9
	Dapsona	3A4
Zgheib y cols. ¹⁹⁰	Cafeína	1A2
	Flurbiprofeno	2C9
	Mefenitoína	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Dapsona	NAT2
Ryu y cols. ¹⁸³	Cafeína	1A2
	Losartán	2C9
	Omeprazol	2C19
	Dextrometorfano	2D6
	Midazolam	3A4
Petsalo y cols. ¹⁸⁴	Melatonina	1A2
	Nicotina	2A6
	Bupropion	2B6
	Repaglinida	2C8
	Losartán	2C9
	Omeprazol	2C19; 3A4
	Dextrometorfano	2D6
	Clorzoxazona	2E1
Midazolam	3A4	

PRIMER AUTOR (REFERENCIA)	FÁRMACOS TEST	ENZIMAS CYP
Ghassabian y cols. ¹⁸⁵	Cafeína	1A2
	Omeprazol	2C19
	Losartán	2C9
	Dextrometorfano	2D6
	Midazolam	3A4
Turpault y cols. ⁶⁸	Cafeína	1A2
	S-Warfarina	2C9
	Omeprazol	2C19
	Metoprolol	2D6
	Midazolam	3A
Stewart y cols. ¹⁹¹	Cafeína	1A2
	Flurbiprofeno	2C9
	Mefenitoína	2C19
	Debrisoquina	2D6
	Clorzoxazona	2E1
	Dapsona	NAT2
Wohlfarth y cols. ¹⁸⁶	Cafeína	1A2
	Tolbutamida	2C9
	Omeprazol	2C19
	Dextrometorfano	2D6
	Midazolam	3A4
Oh y cols. ¹⁸⁷	Cafeína	1A2
	Omeprazol	2C19
	Losartán	2C9
	Dextrometorfano	2D6
	Midazolam	3A4
Cóctel CEIBA (Estudio I de esta Tesis Doctoral)	Cafeína	1A2
	Omeprazol	2C19
	Losartán	2C9
	Dextrometorfano	2D6; 3A4

NAT2: N-acetiltransferasa 2; XO: xantina oxidasa.

El cóctel “GW”, que mide la capacidad hidroxiladora de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4, utiliza DBQ para medir el fenotipo metabólico de CYP2D6. Sin embargo, y a pesar de medir con mucha exactitud la capacidad hidroxiladora de CYP2D6, el uso de este fármaco test muestra algunos problemas. La DBQ puede causar hipotensión en algunos sujetos ⁶³ y actualmente este fármaco solo está disponible en algunos países, lo que dificultaría el uso del cóctel en otros estudios. Por otro lado, en este cóctel se utiliza clorzoxazona como fármaco test para medir la capacidad metabólica de CYP2E1, pero este fármaco inhibe la actividad de CYP3A4, lo cual dificultaría la medida de la capacidad metabólica de esta última enzima.

Otros cócteles de fenotipación ^{64,66,162,182}, entre ellos el cóctel “Karolinska” ¹⁶², también utilizan la DBQ como fármaco test de CYP2D6, con los problemas que ya se han descrito. En algunos estudios la DBQ fue sustituida por metoprolol ^{68,188}. Sin embargo, la utilidad de este fármaco

como fármaco test puede ser reducida puesto que su metabolismo podría no corresponder con el de DBQ, DXT o esparteína en algunas poblaciones caucásicas ^{54,192}. Además, el uso de tramadol como fármaco test podría no ser tampoco indicado debido a la aparición de efectos adversos en voluntarios sanos ¹⁹³. Así, parece que el DXT, debido a que su metabolismo depende de la actividad CYP2D6 ^{194,195} y a su amplia disponibilidad y seguridad ^{192,196,197}, sería el fármaco test de elección para medir la capacidad metabólica de CYP2D6 ⁵¹. Además, la formación de 3-metoximorfinan a partir de DXT por el CYP3A4 ¹⁹⁸⁻²⁰⁰ hace de este fármaco test un posible candidato para medir la capacidad metabólica simultánea tanto de CYP2D6 como de CYP3A4 ²⁰¹.

El fármaco antiepiléptico mefenitoína ha sido utilizado ampliamente en estudios de fenotipo de CYP2C19 mediante el uso de cócteles de fenotipación ^{64,163,188}. Sin embargo, debido a la inestabilidad de las muestras y los efectos adversos que han sufrido algunos voluntarios durante los estudios ^{192,202}, este fármaco test ha sido sustituido por el uso de omeprazol ^{65,68,162,181-186}, que ofrece un mayor perfil de seguridad y que está ampliamente disponible en diferentes países.

Para la medida del fenotipo metabólico de CYP2C9, la tolbutamida ha sido utilizada durante un tiempo como fármaco de elección en varios cócteles ^{66,182,186}, debido a que es hidroxilada casi exclusivamente por CYP2C9 ^{192,203}. Sin embargo, la aparición de efectos adversos como la hipoglucemia ²⁰³, unido al hecho de que este fármaco no está disponible comercialmente en muchos países, ha provocado la búsqueda de nuevos fármacos test para medir la capacidad de CYP2C9. La warfarina y el diclofenaco también se han utilizado también como fármaco test para este enzima en algunos cócteles de fenotipación ^{68,163,181}, pero la elección de estos fármacos está asociada a ciertos inconvenientes. Cuando se utiliza warfarina es necesario administrar vitamina K a los voluntarios para disminuir en lo posible efectos adversos como las hemorragias, y además se deben desarrollar métodos que permitan separar y cuantificar los enantiómeros S y R de warfarina, lo cual restringe su uso como un fármaco test ¹⁸¹. Por su parte, el uso de diclofenaco no se recomienda puesto que, aunque algunos estudios han descrito que CYP2C9*3 podría influenciar la 4-hidroxilación del diclofenaco ²⁰⁴⁻²⁰⁶, en otros trabajos no se ha encontrado relación entre el genotipo CYP2C9 y la 4-hidroxilación de diclofenaco ²⁰⁷ y se ha demostrado una gran variabilidad en la absorción intestinal de este fármaco ²⁰⁸. Sin embargo, el losartán parece un buen candidato como fármaco test para medir la capacidad metabólica de CYP2C9. Se han demostrado diferencias significativas en la farmacocinética de losartán entre diferentes genotipos CYP2C9 ²⁰⁹, y este fármaco se ha utilizado para medir el fenotipo metabólico CYP2C9 tanto en estudios de una única dosis ^{210,211}, como en estudios con cócteles de fenotipación ^{162,183-185}, sin

la aparición de efectos adversos.

La cafeína es el fármaco test más utilizado para medir la capacidad metabólica de CYP1A2^{64-66,68,162,181-183,185,186,188}, puesto que es relativamente seguro. El principal inconveniente del uso de este fármaco test es el hecho de que está presente en varios alimentos y bebidas, por lo que se debe limitar la toma de alimentos que contengan cafeína en los voluntarios que participan en estudios de fenotipo.

Combinaciones diferentes de dextrometorfano, omeprazol, losartán y/o cafeína han sido utilizadas en varios cócteles de fenotipación^{65,68,162,181-186} sin describirse interacciones entre los fármacos propuestos, por lo que su uso conjunto parece ser eficaz y seguro para medir la capacidad hidroxiladora de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4.

En resumen, debido a la capacidad de discriminación de los fenotipos metabólicos, la seguridad de su uso y la amplia disponibilidad en diferentes países, el uso de cafeína (100 mg), losartán (25 mg), omeprazol (20 mg) y dextrometorfano (30 mg) conforman una correcta combinación de fármacos test para generar un cóctel de fenotipación, el cóctel CEIBA, que permita medir simultáneamente la capacidad metabólica de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4.

Estudio II. Estudio de la influencia del polimorfismo del promotor *CYP2D6* -1584C>G en la capacidad metabólica de *CYP2D6*

En este estudio, la presencia del alelo -1584G en la región promotora del gen *CYP2D6* se ha relacionado con un incremento global en la capacidad hidroxiladora de la enzima *CYP2D6*, específicamente en los sujetos portadores de uno y dos genes activos *CYP2D6*. Además, aunque no hubo diferencias significativas en los MRs de DBQ entre los portadores y no portadores del alelo *CYP2D6* -1584G en individuos gUMs de *CYP2D6*, la relación entre este alelo y un menor MR fue evidente (Figura 4).

Los resultados del presente trabajo sugieren que los individuos con genotipo similar *CYP2D6* (a excepción de los gPMs) portadores de la variante *CYP2D6* -1584G frente a los no portadores podrían tener una mayor capacidad hidroxiladora de debrisoquina por la enzima *CYP2D6*. Estos datos concuerdan con resultados previos que indican que los portadores de la variante *CYP2D6* -1584G presentan una mayor expresión proteica de la enzima *CYP2D6*³⁶, lo que podría explicar el resultado de este estudio, y, además, apoyan un estudio previo de pacientes en tratamiento

con tioridazina ⁸⁹, donde se encontró que la variante *CYP2D6* -1584G se asoció a una mayor capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* ⁸⁹.

Sin embargo, la relación entre *CYP2D6* -1584G y un menor MR de DBQ también podría deberse a una asociación por desequilibrio de ligamiento entre este SNP y otros polimorfismos que confieran mayor expresión proteica, o incluso mayor eficiencia enzimática, por lo que estas hipótesis no pueden ser descartadas.

Por otro lado, la única excepción a este resultado se daría entre los individuos que no portan ningún gen *CYP2D6* activo, entre los cuales, al igual que en otro estudio anterior ⁸⁵, no se describió ningún individuo que portara la variante *CYP2D6* -1584G.

La asociación encontrada entre un menor MR y la presencia de la variante *CYP2D6* -1584G demuestra la potencial relevancia del alelo *CYP2D6* -1584G para la actividad de la enzima *CYP2D6* en voluntarios sanos, especialmente en individuos con uno y dos genes activos *CYP2D6*. El análisis de este polimorfismo permitiría incrementar la predicción de la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6* a partir de la extrapolación de los datos genotípicos, aumentando así la exactitud de esta estimación ^{30,88,147}. En base a los resultados de este estudio, se propone la inclusión de la variante *CYP2D6* -1584G en los estudios farmacogenéticos de la enzima *CYP2D6*.

Estudio III. Estudio de la relevancia del genotipo *CYP2D6* y las interacciones farmacológicas en el índice metabólico de aripiprazol

El método presentado en este estudio permite cuantificar ARI y DARI en muestras de plasma humano de manera rápida, reproducible y exacta. Además, este método muestra mejores valores de precisión y especificidad, así como una metodología más simple que otro método de HPLC desarrollado previamente ²¹². Asimismo, el método desarrollado es más asequible, económico y fácil de aplicar que otros métodos basados en la detección por espectrometría de masas (MS), que no están disponibles en muchos laboratorios.

Las concentraciones de ARI y DARI observadas en los 22 pacientes estudiados (Figura 6) fueron similares a las observadas en un estudio anterior con 9 pacientes (2.6 – 482.4 y 1.0 – 192.7 mg/mL para ARI y DARI, respectivamente) ²¹³. Sin embargo, se ha encontrado que las concentraciones plasmáticas de ARI fueron menores que las del rango de referencia recomendadas (100 – 500 ng/mL) ²¹⁴. Este hallazgo podría ser debido a que a este grupo de

pacientes le fueron prescritas menores dosis de ARI (media = 13.5 ± 6.8 mg/día), comparadas con las dosis que se administraron a los pacientes en estudios previos (entre 18 ± 8 y 20 ± 8 mg/día) ²¹⁵⁻²¹⁷.

La comparación de los MR ARI/DARI entre los sujetos en tratamiento en politerapia con inhibidores CYP2D6 y con uno o dos genes activos *CYP2D6* mostró que los individuos con un gen *CYP2D6* activo tuvieron valores de MR ARI/DARI significativamente mayores que aquellos pacientes con dos genes *CYP2D6* activos (Figura 7). En aquellos pacientes que no tomaron inhibidores de CYP2D6 no se encontraron diferencias significativas en el MR ARI/DARI. Sin embargo, la comparación entre sujetos que estaban tomando o no inhibidores CYP2D6 mostró que los individuos con un gen activo en tratamiento con inhibidores CYP2D6 tenían MRs ARI/DARI significativamente mayores que aquellos individuos que no tomaban inhibidores CYP2D6, independientemente del número de genes activos.

En conjunto, los datos obtenidos en este estudio muestran que el grado de inhibición de CYP2D6 depende del número de genes activos *CYP2D6* del paciente. Una idea similar se apuntó en un estudio previo que mostró que el grado de inhibición que presentaban los pacientes tratados con tioridazina cuando se les administraba el fármaco test DBQ dependía no solo de la dosis de tioridazina administrada, sino también del genotipo *CYP2D6* ⁷⁰. Además, estos resultados muestran la influencia del tratamiento concomitante con inhibidores CYP2D6 en el metabolismo de ARI a DARI en pacientes tratados con este antipsicótico, lo cual apoya datos previos similares que se obtuvieron por la medida del MR amitriptilina/nortriptilina ⁴⁶, tioridazina/mesoridazina ^{47,70} o risperidona/9-hidroxisperidona ⁴⁸, sugiriendo que la determinación de las concentraciones plasmáticas, habitual en TDM podría ser una herramienta útil para estudiar las interacciones en pacientes tratados en politerapia con sustratos CYP2D6. Todo esto parece indicar que la genotipación *CYP2D6* de los pacientes en politerapia, junto a la TDM, podrían ayudar a estudiar las interacciones que podrían ocurrir en dichos pacientes.

Sin embargo, este estudio no está exento de limitaciones. El número de sujetos incluidos en el estudio es bajo ($n=22$), por lo que este trabajo necesita ser replicado en una muestra más amplia de pacientes. Además, en este estudio se calcularon los MRs ARI/DARI, pero no se midió la respuesta ni los efectos adversos al tratamiento. A la luz de los resultados, los efectos secundarios podrían ser mayores entre los individuos en tratamiento concomitante con inhibidores CYP2D6 y un solo gen *CYP2D6* activo, como ya se demostró previamente en un

individuo en tratamiento con risperidona ⁶⁹. Por ello son necesarios futuros estudios que superen las limitaciones del presente a fin de asegurar los resultados obtenidos.

En resumen, la metodología propuesta en este estudio ha sido utilizada para evaluar la variabilidad en las concentraciones de ARI y DARI en una muestra de 22 pacientes en tratamiento con ARI. Además, se ha podido comprobar que los pacientes con un solo gen activo *CYP2D6* y en tratamiento con inhibidores de *CYP2D6* tuvieron un MR ARI/DARI significativamente mayor que aquellos en tratamiento con inhibidores *CYP2D6* y dos genes activos, o que aquellos sin tratamiento con inhibidores *CYP2D6*, independientemente del genotipo *CYP2D6* del paciente. Estos datos sugieren que la monitorización terapéutica de los niveles plasmáticos de ARI podría ser utilizada como una medida de la capacidad metabólica de *CYP2D6* en pacientes en tratamiento con este fármaco.

BLOQUE 2. EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTERÉTNICA DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE *CYP2D6*

Estudio IV. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* en ocho poblaciones de voluntarios sanos amerindias de México

Este estudio muestra que existe variabilidad en la frecuencia de individuos con metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* en ocho poblaciones nativas americanas del noroeste de México. El fenotipo gUM de *CYP2D6* se observó en todos los grupos amerindios estudiados en diferentes frecuencias, desde el 5.39% en la población Tepehuana hasta el 20.56% de la población Huichol, siendo la frecuencia en este grupo significativamente mayor que en los grupos Tepehuano y Cora, y que en los mestizos de México ($p < 0.05$), así como mayor en el grupo Mayo que en el Tepehuano ($p < 0.05$).

La frecuencia de gUMs de *CYP2D6* solo ha sido descrita para algunas poblaciones nativas americanas de México, USA y Costa Rica ^{75,98,99,218}. La frecuencia de gUMs de *CYP2D6* en las Tribus Confederadas Salish y Kootenai de USA fue de 1.07% ²¹⁸, menor que cualquiera de las descritas para las ocho poblaciones amerindias estudiadas ($p < 0.05$), mientras que la frecuencia media en las poblaciones amerindias de Costa Rica ⁹⁸ y la descrita en un grupo Tepehuano de México ⁷⁵ (3.6% y 3.3%, respectivamente) fue similar a la descrita en la población Tepehuana, Cora y Seri de este estudio, pero menor a la frecuencia que se encontró en el resto de

poblaciones amerindias ($p < 0.05$). El rango de frecuencias para las multiplicaciones de genes activos *CYP2D6* varió de un 4.3% a un 10.7%, similar a la frecuencia de poblaciones mestizas mexicanas (4.1-12.8%)^{75,84}.

La causa más probable de la multiplicación de genes *CYP2D6* activos en estas poblaciones amerindias podría ser la selección natural. Factores medioambientales, como la dieta, podrían haber ejercido una ventaja selectiva en individuos con genes *CYP2D6* multiplicados, incrementando los ratios de supervivencia de estos sujetos. La base de esta selección podría ser la capacidad de *CYP2D6* para detoxificar alcaloides, habitualmente presentes en las toxinas de algunas plantas²¹⁹. Así, en las poblaciones nativas americanas, la restricción en el acceso a comida ha originado la búsqueda de recursos alternativos, como algunas especies de plantas. De esta manera, se habría favorecido la supervivencia de sujetos con alta capacidad para detoxificar toxinas de plantas, es decir, con más de 2 genes *CYP2D6* activos. Se cree que un fenómeno similar ocurrió en Etiopía y Arabia Saudita⁷, donde ha sido descrita una alta frecuencia de genes activos *CYP2D6*^{80,91}.

Este estudio muestra una frecuencia más alta de duplicaciones/multiplicaciones de genes activos *CYP2D6* en poblaciones amerindias mexicanas del noroeste que en mestizos de México. Además, la frecuencia de gUMs de *CYP2D6* varía no solo entre la población nativa americana y la mestiza, sino también entre las ocho poblaciones nativas americanas estudiadas. Teniendo en cuenta que el fenotipo UM se ha relacionado con fallo terapéutico o con tendencia a desarrollar reacciones adversas, potencialmente mortales, a ciertos fármacos sustratos de *CYP2D6*^{4,32,33}, la información obtenida podría ser útil para generar estrategias terapéuticas enfocadas a las poblaciones amerindias de México y otras similares, como se discutirá en más detalle en el apartado "*VI. Discusión general*".

Estudio V. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de España

Este estudio es el mayor realizado hasta la fecha que analiza las frecuencias alélicas y genotípicas de *CYP2D6* en la población española ($n=805$). Además, es el primer estudio donde se calcula la frecuencia de gUMs de *CYP2D6* contabilizando únicamente aquellos individuos con más de dos genes *CYP2D6* activos, es decir, identificando claramente qué alelo *CYP2D6* está multiplicado y eliminando del grupo de gUMs a los individuos con genes *CYP2D6* no activos

multiplicados. Este trabajo describe una frecuencia de gUMs de CYP2D6 de 5.34% y de multiplicación de genes activos CYP2D6 de 3.66% en la población española estudiada. La Tabla XXII muestra las frecuencias de genes CYP2D6 multiplicados y de gUMs de CYP2D6 en diferentes poblaciones de Europa estudiadas.

Tabla XXII. Frecuencia de genes CYP2D6 multiplicados y de gUMs CYP2D6 en las poblaciones europeas de voluntarios sanos con un número de individuos estudiados mayor o igual a 100.

País	n	CYP2D6*1xN o *2xN	CYP2D6*4xN	CYP2D6*10xN	% gUMs	Referencia
Alemania	195	1.5*	-	-	1.0*	60
Croacia	200	4.0*	-	-	4.0*	220
España	217	3.5*	-	-	7.0*	95
España	147	5.1*	-	-	10.2*	96
España	105	3.8	0.5	-	-	103
España	327	4.1	0.3	-	-	30
España	805	3.7	0.4	0	5.3	Estudio V de la presente Tesis Doctoral
Grecia	283	3.7*	-	-	7.4*	221
Hungría	112	1.8	0	-	1.9	222
Italia	360	4.2*	-	-	8.3*	223
Italia	122	0.4	0	-	0.8	224
Portugal	100	6.1	0	-	8.4	104
Portugal	300	3.0	0	0.2	4.7	Estudio VI de la presente Tesis Doctoral
República Checa	223	3.1*	-	-	3.6	225
Rusia	290	2.2	0	-	3.4	226
Suiza	165	2.1	0.3	-	3.0	227
Turquía	404	6.0*	-	-	8.7	228

*La presencia de alelos CYP2D6 no activos multiplicados no puede ser descartada. n = número de individuos.

Previamente se había descrito una alta frecuencia de gUMs CYP2D6 en población de voluntarios

sanos de España (7-10.2%)^{95,96}. Sin embargo, en estos trabajos no se identificó claramente cuál era el alelo *CYP2D6* multiplicado^{95,96}, por lo que la frecuencia de gUMs *CYP2D6* descrita en estos estudios podría estar sobrerrepresentada.

En un estudio de 217 voluntarios sanos españoles se analizaron los alelos *CYP2D6**3, *4, *5, *9 y la presencia de genes *CYP2D6* multiplicados⁹⁵ y se mostró la presencia genes *CYP2D6* duplicados en 15 individuos, siendo dos de ellos también portadores del alelo de actividad disminuida *CYP2D6**9⁹⁵. Los autores del trabajo asumen que *CYP2D6**9 no es el alelo *CYP2D6* duplicado en base a un trabajo anterior con muestras de voluntarios suecos donde se caracteriza el alelo multiplicado en cinco sujetos, identificándolo como el alelo con actividad *CYP2D6**2⁷⁹. Sin embargo, la presencia de *CYP2D6**9x2 ha sido descrita en dos pacientes psiquiátricos españoles²²⁹ y en el estudio de 217 voluntarios españoles no se realiza ninguna prueba específica que descarte que el *CYP2D6**9 pueda estar duplicado⁹⁵. Por todo ello podríamos pensar que *CYP2D6**9, o bien otros alelos que no se estudiaron, podrían estar presentes en los individuos portadores de copias extras del gen *CYP2D6*, lo que podría implicar que esos sujetos se clasificaran como gEMs de *CYP2D6* en lugar de gUMs.

De igual modo, otro estudio identifica, en un total de 147 voluntarios, 15 individuos con alelos *CYP2D6* duplicados, pero en dos de los individuos está presente el alelo *CYP2D6**4⁹⁶. La metodología llevada a cabo en este trabajo no permite identificar si el alelo *CYP2D6* duplicado es el *4 o no, pero en cualquier caso estos dos individuos no serían gUMs de *CYP2D6*, puesto que el valor que obtendrían puntuando los alelos sería de 1 o 2 (ver el apartado de la introducción “3.3. Estimación del fenotipo metabólico *CYP2D6* a partir de los datos de genotipo *CYP2D6*”). Además, en este estudio se identifica la presencia del alelo *CYP2D6**2 por la detección del SNP *CYP2D6* 2850C>T⁹⁶. Sin embargo, este SNP no está presente únicamente en el *CYP2D6**2, sino que se ha descrito asociado a más de 50 alelos *CYP2D6*, entre ellos algunos actividad disminuida o nula²⁹, lo cual implica que el “*CYP2D6**2” detectado en estas muestras podría realmente corresponder con un alelo *CYP2D6* sin actividad o con actividad disminuida. De esta manera, el número real de individuos gUMs en este estudio⁹⁶ podría ser inferior al reportado. Por último, únicamente los alelos *CYP2D6**3, *4 y *5 fueron además analizados en este estudio, por lo que la presencia de otros alelos con actividad disminuida o nula y también frecuentes en poblaciones caucásicas europeas, como el *CYP2D6**6, *CYP2D6**10 o *CYP2D6**41 (ver la publicación A7.2) no puede ser descartada en los individuos con multiplicaciones del gen *CYP2D6*.

El Estudio V de la presente Tesis Doctoral que identifica la multiplicación de genes *CYP2D6* activos y gUMs en una población española de voluntarios sanos analiza un número mayor de alelos *CYP2D6* que los estudios anteriores^{30,95,96,103}, lo que permite realizar con mayor exactitud la asignación de los individuos en un grupo metabólico u otro.

La comparación de frecuencias de gUMs de *CYP2D6* con otras poblaciones caucásicas de Europa (Tabla XIX) muestra una frecuencia similar entre las poblaciones donde se han estudiado la presencia de genes no activos *CYP2D6* multiplicados (3.0 – 5.4%), con algunas excepciones, como las poblaciones estudiadas de Hungría e Italia, donde la frecuencia parece menor (alrededor de 1%)^{222,224}.

Adicionalmente, el análisis de las frecuencias de gUMs de *CYP2D6* estimadas en los estudios de poblaciones europeas (Tabla XIX) donde no se detecta si el alelo *CYP2D6* multiplicado tiene o no actividad describen una frecuencia mayor de gUMs de *CYP2D6*, valor que podría estar sesgado por la inclusión en este grupo de individuos portadores de genes no activos *CYP2D6* multiplicados.

En resumen, el porcentaje de gUMs de *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de España encontrado en este estudio es 5.3%, lo que está en consonancia con los datos de fenotipación (Figura 1) pero no apoya la alta frecuencia de gUMs que se describió previamente en la población española^{95,96}, cuya causa puede deberse a la no identificación del alelo *CYP2D6* multiplicado en los estudios anteriores.

Estudio VI. Estudio de la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Portugal

Hasta la fecha, este es el mayor estudio de frecuencias alélicas y de grupos funcionales *CYP2D6* llevado a cabo en una población de voluntarios sanos de Portugal. En este trabajo se encontró una frecuencia de gUMs de 4.7% y de multiplicación de genes activos *CYP2D6* de 3%. Las frecuencias de gUMs y genes activos *CYP2D6* multiplicados en poblaciones europeas se muestran en la Tabla XXII.

La frecuencia de individuos gUMs y de genes activos *CYP2D6* en la población de Portugal es casi la mitad en este estudio que en otro de una población portuguesa¹⁰⁴, donde la frecuencia de gUMs fue de 8.4% y de genes activos multiplicados de 6.1%. Sin embargo, el trabajo anterior incluyó un bajo número de voluntarios sanos (n=100¹⁰⁴ vs. n=300 en este estudio), lo cual podría

sesgar los resultados obtenidos. Por otro lado, el cálculo del porcentaje de individuos gUMs cuando el número de individuos es igual a 100 tiene que dar siempre un porcentaje no decimal (si existe un individuo gUM de CYP2D6 en un total de 100, la frecuencia sería de 1%; si existen 2 gUMs, entonces sería del 2%; y así sucesivamente). Sin embargo, el porcentaje de gUMs de CYP2D6 que se obtuvo en el estudio anterior es un número decimal ¹⁰⁴. Podría suceder que finalmente no se obtuvieran los genotipos de todos los individuos, y por eso el número total sea menor a 100, pudiéndose obtener así un valor decimal de porcentaje. Pero esto no es lo que parece que ocurre en el estudio anterior, puesto que en el apartado “Resultados” de la publicación ¹⁰⁴ se especifica que se analizan 200 cromosomas, es decir, 100 individuos. La frecuencia que se muestra en el artículo no puede volver a ser recalculada, puesto que no se dan los datos de genotipo por individuo. Por todo lo anterior, el dato de un 8.4% de gUMs en una población portuguesa de voluntarios sanos ¹⁰⁴ debería ser utilizado, al menos, con cautela.

Por otro lado, es conocida la relación entre el metabolismo incrementado de CYP2D6 y su implicación en el fallo en la respuesta terapéutica ^{111,112} o el aumento de los efectos adversos ^{4,127,129,131,230} cuando los pacientes son tratados con fármacos (como fluoxetina o amitriptilina) o profármacos (como codeína o tamoxifeno) de la enzima CYP2D6. Por ello, el conocimiento de la frecuencia de gUMs en una población de Portugal podría facilitar que se lleven a cabo estrategias concretas para favorecer la mejor respuesta terapéutica con el menor número de efectos adversos en esta población.

Estudio VII. Estudio de la variabilidad interétnica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en poblaciones iberoamericanas

Este es el primer estudio en poblaciones iberoamericanas donde se describen las frecuencias alélicas *CYP2D6* y de fenotipos metabólicos estimados a partir de los genotipos *CYP2D6* en poblaciones de voluntarios sanos con diferente componente étnico, independientemente del país de origen. En este estudio se han incluido 1363 voluntarios sanos de origen amerindio, 1506 de origen caucásico, 83 de origen africano, 173 de origen judío Ashkenazi y 2102 de origen no definido o mestizos, lo que hace de este trabajo uno de los estudios de variabilidad alélica y genotípica de *CYP2D6* con mayor población estudiada.

Los resultados obtenidos parecen mostrar una frecuencia ligeramente mayor de genes activos *CYP2D6* multiplicados en judíos Ashkenazi (6.36%) y los voluntarios con ancestría

mayoritariamente africana (6.02%) que en los voluntarios de otro origen étnico (3.52 – 3.85%; Tabla XIII). El resultado de los judíos Ashkenazi apoya resultados previos similares en una población de judíos Ashkenazi de USA ²³¹ y, además, la frecuencia en voluntarios que se declararon con ascendencia africana está de acuerdo con un dato anterior que muestra una mayor frecuencia media de genes activos *CYP2D6* multiplicados en poblaciones negras de África (5.80%), como puede revisarse en la publicación A7.2. En cuanto a la frecuencia de gUMs *CYP2D6*, destaca la alta frecuencia de gUMs de *CYP2D6* de la población de judíos Ashkenazi (11.50%), similar a la reportada en otro estudio de la población judía Ashkenazi ²³¹. En el resto de poblaciones, los valores encontrados parecen fluctuar ligeramente, sin destacar ningún resultado por presentar una frecuencia más alta o baja que el resto (5.38% – 8.43%). La frecuencia de gUMs encontrada en la población de origen amerindio (7.19%) es similar a la reportada anteriormente (7.67%; publicación A7.2). Similarmente, la frecuencia encontrada en la población de origen caucásica (5.38%) es semejante a la reportada para poblaciones caucásicas de la zona Sur y Mediterránea Europea (5.82%), hecho que puede deberse a que las poblaciones caucásicas incluidas en este estudio procedían de España y Portugal mayoritariamente, y en menor proporción de caucásicos de Cuba, donde históricamente existe una gran migración desde España ^{232,233}. En cuanto a la frecuencia de gUMs *CYP2D6* en la población mestiza de Latinoamérica, parece mayor en este estudio (6.60%) que la frecuencia media reportada anteriormente (3.34%; publicación A7.2). Debido a que esta población incluye a individuos con diferente grado de mestizaje, principalmente entre las poblaciones de origen nativo americano, caucásico y africano, la frecuencia que se obtiene puede variar en función de la proporción del componente amerindio, caucásico o africano que tenga cada individuo. Así, se ha mostrado, por ejemplo, que la población mestiza de México tiene una baja proporción de componente ancestral africano (alrededor del 5%) mientras que en algunas poblaciones mestizas del Caribe y de América Central o del Sur la proporción de ancestría africana puede ser de hasta un 50% ^{93,232–234}.

Si bien no es el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, sí que parece interesante destacar, puesto que es la primera vez que se estudia en profundidad un gran número de voluntarios sanos de Iberoamérica agrupados por origen étnico y no por países, la alta frecuencia del alelo *CYP2D6*4* en la población iberoamericana de origen caucásico, y las de los alelos *CYP2D6*17* y **29* en la población latinoamericana de origen africano, en correspondencia con lo descrito anteriormente (publicación A7.2). La alta frecuencia de estos alelos en poblaciones con un componente étnico mayoritario podría apuntar hacia una distribución de las variantes alélicas de

CYP2D6 particular según el origen étnico de la población, aunque estos datos deben ser analizados en mucha más profundidad en futuros estudios.

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, existen varias limitaciones en este trabajo. Por una parte, el número de voluntarios con un origen étnico mayoritario africano es bajo ($n=83$), por lo que futuros estudios que amplíen o complementen este deben incluir un mayor número de sujetos latinoamericanos con este componente ancestral. Además, el análisis de los datos obtenidos parecen mostrar un porcentaje ligeramente mayor del alelo *CYP2D6 wt* en la población nativa americana (63.59%) que en el resto de poblaciones (40.77 – 50.38%). En este estudio, el alelo *CYP2D6 wt* se asigna cuando ninguno de los otros alelos *CYP2D6* estudiados está presente. Se sabe que las poblaciones amerindias no han sido profundamente caracterizadas (publicación A7.2) y pueden tener alelos no presentes en otras poblaciones. Por ejemplo, recientemente se ha encontrado y postulado un origen amerindio para el alelo *CYP2D6*82*¹⁰⁶. Así, es posible que más alelos no conocidos, con diferentes grados de actividad, estén presentes en las poblaciones nativas americanas, por lo que son necesarios futuros estudios que profundicen en esta línea. Por último, en los estudios de PGx de poblaciones y de variabilidad de enzimas CYPs, como *CYP2D6*, la clasificación de los individuos en las distintas etnias se hace por autodeterminación, es decir, los rasgos morfológicos y culturales ayudan al propio individuo a reconocerse como miembro de un grupo étnico u otro^{30,75,76,84,235}. Esta ha sido la forma de clasificar a los voluntarios sanos incluidos en este estudio en un grupo poblacional u otro. Sin embargo, existen actualmente marcadores informativos de ancestría (AIMs, del inglés “ancestry informative markers”) específicos para cada grupo étnico que permiten una clasificación de los individuos más veraz, pues se ha demostrado que la clasificación por autodeterminación no siempre se corresponde con la clasificación por AIMs⁹³. De esta manera, podría ser interesante averiguar la variabilidad de *CYP2D6* no solo en distintos grupos étnicos “autodeterminados” por los individuos, como se ha hecho en este estudio, sino también conocer dicha variabilidad en función a los grupos étnicos determinados por análisis de AIMs. Así, se podría estudiar con mayor veracidad el posible origen étnico de los diferentes alelos *CYP2D6*.

En resumen, este estudio de poblaciones iberoamericanas ha encontrado una frecuencia de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs de *CYP2D6* de 3.89 y 7.26%, respectivamente, en la población amerindia; 3.52 y 5.38%, respectivamente, en la población caucásica; 6.02 y 8.43%, respectivamente, en la población africana; 6.36 y 11.56%, respectivamente; y 3.78 y 6.57% en la población mestiza.

BLOQUE 3. EVALUACIÓN DE LAS IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL METABOLISMO ULTRARRÁPIDO DE CYP2D6

Estudio VIII. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 y síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario en una población de mujeres sanas de Cuba

Los resultados de este estudio muestran, por primera vez, que existe una relación entre la capacidad hidroxiladora CYP2D6 incrementada (mUM de CYP2D6) y el riesgo a desarrollar síntomas de bulimia en mujeres sanas de Cuba.

Estos datos apoyan resultados previos que encontraron una mayor frecuencia de sujetos con más de dos de genes activos *CYP2D6* (gUMs) entre los pacientes con TCAs ¹⁵⁴. Tomando ambos resultados en conjunto, se podría sugerir que el incremento en la actividad enzimática CYP2D6 podría empeorar los síntomas relacionados con la bulimia nerviosa en voluntarias sanas, y así influenciar en el riesgo de sufrir TCAs.

Adicionalmente, la potencial implicación de CYP2D6 en psicopatología debido a su papel en el metabolismo de sustratos endógenos ^{19,22,24,49,146–148,150} es apoyada por datos previos que señalan que los PMs de CYP2D6 podrían presentar protección frente al desarrollo de psicopatología ^{148–150}.

Sin embargo, estos resultados deberían ser tomados con cautela antes de replicarse en diferentes poblaciones y con mayor número de mujeres sanas o de pacientes con desórdenes alimentarios. Así, en los estudios posteriores que intenten replicar este se debería asegurar que las poblaciones estuviesen libres de tratamiento farmacológico con sustratos CYP2D6, los cuales son comúnmente prescritos para el tratamiento de desórdenes alimentarios y para tratar otras afecciones comunes.

Los porcentajes de mujeres con cero, dos o más de dos genes activos *CYP2D6*, y las frecuencias de mujeres clasificadas como PMs y UM de CYP2D6 fueron similares a las previamente descritas para la población general de Cuba ^{30,147}. La correlación entre duplicación/multiplicación de genes activos *CYP2D6* y el mUM de CYP2D6 no fue exacta, puesto que el grupo mUM solo incluyó el 44.4% de los sujetos con más de dos genes activos *CYP2D6* (gUMs). Este resultado apoya datos previos de trabajos que estudiaron la relación entre el

número de genes activos *CYP2D6* y la capacidad hidroxiladora de *CYP2D6*, y que han sido revisados en el apartado de la introducción “4.1. Discordancia entre *gUMs* y *mUMs*: estudios de poblaciones”. De esta manera, los resultados obtenidos en este estudio parecen apoyar la idea de que la evaluación de la capacidad hidroxiladora del *CYP2D6* no puede ser directa y simplemente extrapolada de los genotipos, salvo para los individuos que no portan genes activos *CYP2D6*. De hecho, la medida de la capacidad hidroxiladora usando DBQ como fármaco test parece ser más segura que el genotipo, al menos en esta población, puesto que mientras que por genotipo se extrapolaron 12 *gUMs* de *CYP2D6*, por fenotipo solo se identificaron 9 *mUMs* de *CYP2D6*. Este hecho podría explicar parcialmente por qué la relación entre la subescala “EDI-bulimia” y el número de genes activos *CYP2D6* no fue significativa, a diferencia de la relación entre “EDI-bulimia” y la capacidad hidroxiladora de la enzima *CYP2D6*.

La escala “EDI-bulimia” mide los síntomas relacionados con el fallo de control sobre los comportamientos de toma de comida y purga. El único fármaco antidepressivo aprobado por la FDA para el tratamiento de estos síntomas es la fluoxetina, sustrato de la enzima *CYP2D6*, y se recomienda que estos síntomas en pacientes con desórdenes alimentarios y un diagnóstico de bulimia nerviosa se traten con altas dosis de fluoxetina en comparación con otros desórdenes ¹³⁶. Puesto que la enzima *CYP2D6* está involucrada en el metabolismo de fluoxetina y otros inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina utilizados en el tratamiento de otros TCAs, es posible especular que estas altas dosis podrían ser necesarias para tratar la bulimia en individuos con una actividad enzimática *CYP2D6* muy rápida.

Los datos obtenidos en este estudio podrían, además, apoyar resultados previos que muestran una alta frecuencia de *UMs* de *CYP2D6* entre los casos de suicidio ¹⁵⁸, los individuos con una historia de comportamientos suicidas entre los pacientes con ED o con comportamientos suicidas severos entre los supervivientes de un intento suicida ^{157,160}, individuos que intentaron suicidarse con al menos un desorden de personalidad ¹⁵³, o en pacientes con trastornos mentales persistentes bajo tratamiento antidepressivo con sustratos *CYP2D6* ¹¹¹, todas las anteriores condiciones comunes entre los pacientes con ED ¹³⁸.

En resumen, los datos de este estudio apoyan la implicación de *CYP2D6* en la vulnerabilidad a sufrir TCAs, principalmente por el empeoramiento de síntomas relacionados con la bulimia nerviosa en voluntarias sanas.

Estudio IX. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido CYP2D6 e historia de tentativa suicida en pacientes con trastornos del comportamiento alimentario de México

Los presentes resultados muestran que existe una asociación entre el número de genes activos CYP2D6 y la presencia de historia de tentativa suicida entre los pacientes con TCAs diagnosticados con bulimia nerviosa purgativa, siendo mayor la frecuencia de gUMs CYP2D6 en estos pacientes (33.3%) que entre aquellos pacientes sin historia de tentativa suicida (8.5%). Además, y aunque esta relación no es estadísticamente significativa, también se encontró que, independientemente del trastorno del comportamiento alimentario específico diagnosticado en los pacientes, los gUMs de CYP2D6 mostraron una frecuencia más alta en los pacientes con historia de tentativa suicida frente a los que nunca intentaron suicidarse (21.4% vs. 8.4%).

Puestos en conjunto, los resultados de este estudio reafirman datos previos que mostraban asociación entre gUMs de CYP2D6 e historia de tentativa suicida en una población de pacientes diagnosticados con TCAs de España ¹⁵⁷. Adicionalmente, los resultados obtenidos en este estudio apoyan también otros datos que mostraron una relación entre el metabolismo incrementado de CYP2D6 y el suicidio ^{158–160}.

La relación entre CYP2D6 y suicidio podría deberse, por un lado, a la participación de esta enzima en el metabolismo de sustancias endógenas ^{22,143–145} (para una visión más completa, repasar el apartado “6.2. *Metabolismo endógeno de CYP2D6: relación de la actividad CYP2D6 con rasgos de personalidad, vulnerabilidad a psicopatología, trastornos del comportamiento alimentario y suicidio*” de la introducción de la presente Tesis Doctoral), y por otro, a la implicación de CYP2D6 en el metabolismo de fármacos usados para el tratamiento de TCAs, como son los antidepresivos ^{111,112,136,140}, cuya relación ya se ha descrito detalladamente en el apartado “6.1. *Relación entre la variabilidad funcional CYP2D6 y el metabolismo de fármacos mediado por CYP2D6*”.

En relación con el metabolismo de sustancias endógenas, podría suceder, como se ha sugerido previamente ^{23,24}, que la implicación de CYP2D6 en el metabolismo de la serotonina ^{22,146} de lugar a posibles diferencias basales en el tono serotoninérgico, y consecuentemente en el dopaminérgico (puesto que la neurotransmisión dopaminérgica está regulada en parte por la serotonina ^{23,24}), entre los diferentes grupos funcionales de CYP2D6. De esta manera, los distintos fenotipos metabólicos de CYP2D6 podrían potencialmente explicar diferencias en el comportamiento que se deban, al menos en parte, a un distinto nivel de serotonina y/o

dopamina. En relación a lo anterior, CYP2D6 se ha relacionado con diferencias en rasgos de personalidad ^{49,147}, con la presencia de trastornos mentales y de personalidad ¹⁵³ o con diferencias en la función neurocognitiva y la vulnerabilidad a psicopatología ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. En relación al último dato, los resultados apuntan a que los PMs de CYP2D6 podrían poseer cierta protección a desarrollar psicopatología ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, mientras que, por el contrario, se ha encontrado que los individuos con dos o más genes activos *CYP2D6* son más frecuentemente diagnosticados con al menos un trastorno de personalidad entre los individuos que intentaron suicidarse en comparación con aquellos con un o ningún gen activo *CYP2D6* ¹⁵³. Puestos en conjunto, todos estos datos podrían apoyar la hipótesis de que los individuos con una capacidad metabólica incrementada de CYP2D6 serían más propensos a cometer una tentativa suicida más severa ¹⁶⁰, que potencialmente puede derivar en la muerte por suicidio ¹⁵⁸.

Pero además, la relación CYP2D6 – suicidio puede ser explicada por la participación de la enzima CYP2D6 en el metabolismo de fluoxetina ⁹, que es el único antidepresivo aprobado por la FDA para el tratamiento de la bulimia nerviosa a altas dosis ¹⁵⁵, y es el fármaco de elección en monoterapia para el tratamiento de bulimia nerviosa en el hospital de México donde fueron atendidos los pacientes del estudio. En este sentido, se ha demostrado una peor respuesta de los gUMs de CYP2D6 al tratamiento antidepresivo con dosis estándar ^{111,112}, y una mayor frecuencia de gUMs entre los pacientes con depresión hospitalizados que desarrollaron síntomas relacionados con mayor riesgo de cometer un intento suicida ¹⁵⁹ y entre los pacientes con trastornos mentales persistentes bajo tratamiento antidepresivo con sustratos CYP2D6 ¹¹¹. De esta manera, los pacientes con una alta capacidad metabólica de CYP2D6 podrían tener concentraciones plasmáticas de fluoxetina más bajas ⁹ y, consecuentemente, responder peor al tratamiento ^{111,112}, lo que daría lugar al abandono de la terapia farmacológica (como se ha mostrado en el Estudio IX de la presente Tesis Doctoral). Todo lo anterior podría derivar hacia un intento suicida ^{157,159} potencialmente severo ¹⁶⁰ que acabe con la muerte por suicidio ¹⁵⁸ del paciente.

Sin embargo, los resultados de este estudio deben ser tomados con reserva hasta que el estudio sea replicado en una cohorte independiente de pacientes con TCAs.

Para la población estudiada con TCAs, las frecuencias de gUMs y gPMs de CYP2D6 fueron de 9.3 y 2.5%, respectivamente. Estas frecuencias parecen ser similares a las descritas para poblaciones mestizas de México ^{75,84}. Sin embargo, entre los pacientes que intentaron suicidarse, la frecuencia de gUMs de CYP2D6 fue mayor (21.4%) que las reportadas para las

poblaciones mestizas de México (4.5 – 9.1%)^{75,84} y la población nativa Tepehuana de México (3.3%)⁷⁵.

En resumen, una relación entre el número de individuos con más de genes activos *CYP2D6* y una historia de tentativa suicida se ha mostrado en pacientes de México diagnosticados con bulimia nerviosa purgativa. Estos resultados pueden explicarse por la relación de *CYP2D6* con el metabolismo de endógenos como serotonina, o bien por la implicación en el metabolismo de fármacos antidepresivos, como la fluoxetina. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estos resultados.

Estudio X. Estudio de la relación entre el fenotipo metabólico ultrarrápido *CYP2D6* y la discontinuación temprana del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México

Los resultados de este estudio muestran una relación entre los grupos metabólicos de *CYP2D6* y el abandono temprano del tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina. Así, los pacientes Mexicanos con depresión mayor y más de dos genes activos *CYP2D6* (gUMs) que comienzan un tratamiento antidepresivo en monoterapia por las dosis más bajas recomendadas de fluoxetina o amitriptilina dejan el tratamiento antidepresivo en el primer mes (primeras cuatro semanas). Adicionalmente, se ha observado que los pacientes gPMs de *CYP2D6* no abandonan el tratamiento en las 12 semanas de seguimiento, apoyando resultados previos que no encontraron una mayor discontinuación del tratamiento antidepresivo entre los individuos gPMs *CYP2D6**4/*4¹⁴⁰.

Estos resultados apoyan datos anteriores que encontraron que los pacientes con más de dos genes activos *CYP2D6* tratados con antidepresivos sustratos de la enzima *CYP2D6* tendían a no responder al tratamiento^{111,112}, lo cual puede estar relacionado además con el hecho de que los gUMs de *CYP2D6* presentan mayor riesgo de desarrollar síntomas relacionados con el suicidio en los pacientes con depresión hospitalizados¹⁵⁹ y de cometer un intento suicida en pacientes con trastornos alimentarios¹⁵⁷ (que son tratados en muchos casos con sustratos *CYP2D6*^{136,155}). En resumen, parece que los gUMs de *CYP2D6*, al no responder a la terapia antidepresiva^{111,112}, abandonan el tratamiento, pudiendo cometer un intento suicida^{157,159} potencialmente mortal¹⁵⁸.

Sin embargo, este estudio no está exento de limitaciones. Por un lado, el estudio es naturalístico y se incluyeron los pacientes con trastorno depresivo mayor en monoterapia con fluoxetina o

amitriptilina, independientemente de la dosis que recibían, por lo que esta no fue controlada. Además, no se evalúan las concentraciones plasmáticas del fármaco y/o metabolito ni tampoco la eficacia del tratamiento farmacológico. Por lo tanto, deberían diseñarse futuros estudios para evaluar diferentes dosis de inicio así como las concentraciones plasmáticas del fármaco y sus efectos.

En resumen, este trabajo muestra la asociación entre el gUM de CYP2D6 y la discontinuación del tratamiento antidepresivo en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina en pacientes con trastorno depresivo mayor de México.

DISCUSIÓN GENERAL

La presente Tesis Doctoral ha sido dividida en tres bloques de estudios interrelacionados entre sí, con un eje común: la evaluación, variabilidad e implicación clínica del fenotipo metabólico de CYP2D6, y concretamente, del fenotipo metabólico ultrarrápido.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha propuesto una metodología para medir a través de la administración de un fármaco test la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 (y, adicionalmente, de otros CYPs), se ha mostrado cómo la relación entre fenotipo metabólico CYP2D6 medido por la administración de un fármaco test y el estimado a partir del genotipo CYP2D6 puede ser ajustada mediante el estudio del polimorfismo CYP2D6 -1584C>G y se ha presentado cómo la monitorización terapéutica del fármaco aripiprazol puede ser utilizada para medir las interacciones farmacológicas que pueden surgir durante el tratamiento en politerapia de pacientes psiquiátricos tratados con este fármaco. Adicionalmente, y en concreto respecto del fenotipo UM de CYP2D6, se ha mostrado que su variabilidad en poblaciones iberoamericanas de diferente origen étnico, concretamente entre ocho poblaciones amerindias de México, y dos poblaciones caucásicas de la península ibérica, una de España y otra de Portugal. Finalmente, ha sido demostrada la relación entre el fenotipo UM de CYP2D6 y el riesgo a desarrollar síntomas bulímicos, a cometer un intento suicida entre los pacientes con bulimia nerviosa purgativa y a abandonar el tratamiento antidepresivo con sustratos de la enzima CYP2D6.

El cóctel CEIBA propuesto en el Estudio I, que permite teóricamente medir la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 junto a la de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4 ha sido, con posterioridad y fuera de los estudios de la presente Tesis Doctoral, desarrollado y validado en 20

voluntarios sanos ²³⁶, demostrando así que potencialmente puede ser utilizado para medir la capacidad hidroxiladora de estas enzimas.

Adicionalmente, el Estudio III mostró cómo la TDM, en concreto del fármaco aripiprazol, puede ser utilizada para medir interacciones entre fármacos sustratos de CYP2D6, lo que apoya resultados previos en esta línea con otros sustratos de CYP2D6, como nortriptilina, tioridazina y risperidona ^{46-48,69,70}. Además, se encontró que el número de genes activos *CYP2D6* influyó en la interacción farmacológica. Sin embargo, este estudio incluyó un número reducido de pacientes y debería ser replicado en un grupo mayor, donde podría ser interesante estudiar si el polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G también influye en las interacciones entre fármacos sustratos de CYP2D6, en base a los resultados del Estudio II y otros anteriores ^{36,88} que muestran que este SNP podría estar relacionado con la capacidad hidroxiladora de CYP2D6.

Con respecto a la variabilidad del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6, se ha mostrado que existe un amplio rango de frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y de gUMs de CYP2D6 entre poblaciones con diferente origen étnico. Las frecuencias mayores de gUMs han sido encontradas en las poblaciones mexicanas de origen amerindio Huichol (20.56%), Guarijía (20.0%), Mayo (18.18%), y Mexicanera (15.38%), mostrando valores más moderados aunque también altos en los Tarahumaras (12.15%), Seris (10.52%) y Coras (8.64%), y siendo menor en los Tepehuano (5.39%), en concordancia con datos previos reportados en la población Tepehuana ⁷⁵. Sin embargo, cuando estas frecuencias se comparan con la obtenida en el Estudio VII para la población amerindia, independientemente del país de origen o grupo amerindio específico al que pertenezcan los individuos (7.19%), parece que las frecuencias encontradas en las ocho poblaciones amerindias de México estudiadas son mayores. Esto podría deberse a que los diferentes grupos amerindios suelen vivir de manera aislada y sin contacto con el resto de poblaciones. Así, factores locales han podido influir en la selección de unos alelos *CYP2D6* u otros en diferentes grupos amerindias, por ejemplo, la posible selección de alelos *CYP2D6* activos multiplicados en zonas donde existe una dieta con alta concentraciones de alcaloides tóxicos que son metabolizados por CYP2D6 ⁷.

Por otro lado, los voluntarios sanos incluidos en los Estudios VI, V, VI y VII han sido genotipados para *CYP2D6* y su capacidad hidroxiladora ha sido estimada a partir de los datos de genotipo *CYP2D6*, pero no se ha evaluado el fenotipo metabólico a partir de la administración de un fármaco test. Ya se ha comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral que no siempre existe una correspondencia entre el genotipo CYP2D6 y el fenotipo medido con un fármaco test,

principalmente entre los UMs de CYP2D6 (ver en detalle el apartado de la introducción “4.1. *Discordancia entre gUMs y mUMs: estudios de poblaciones*”). Por ello, parece sensato sugerir que deberían llevarse a cabo más estudios en esta área, a fin de estudiar en profundidad la relación entre los gUMs CYP2D6 descritos para las poblaciones en los Estudios VI, V, VI y VII y la capacidad hidroxiladora de CYP2D6. Para ello, se podría utilizar el “cóctel CEIBA” propuesto en el Estudio I, que además de medir la capacidad metabólica de CYP2D6, permitiría evaluar simultáneamente la de otras enzimas CYPs relevantes en el metabolismo de fármacos. Adicionalmente, se podría comprobar si los resultados del Estudio II se replican en poblaciones con diferente origen étnico, es decir, se podría evaluar en qué medida el polimorfismo CYP2D6 - 1584C>G influye en la capacidad metabólica de CYP2D6 en poblaciones con un componente ancestral mayoritario amerindio, caucásico europeo o africano. Además, debería también estudiarse la influencia de otros factores en la capacidad hidroxiladora de CYP2D6, como epigenéticos y/o ambientales, puesto que se ha comprobado que también influyen en la capacidad metabólica enzimática ^{5,6,237}.

Los Estudios I, II, IV, V, VI y VII de la presente Tesis Doctoral, que como se ha mostrado están ampliamente interrelacionados, se enmarcan dentro de los estudios de la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (RIBEF) ²³⁸. Esta Red promueve la docencia, investigación e implementación de la PGx en humanos en la asistencia clínica, centrándose en los países latinoamericanos y de la península ibérica. Uno de los principales proyectos de esta red, el proyecto CEIBA, pretende estudiar la variabilidad de las enzimas CYP más importantes implicadas en el metabolismo de fármacos, como CYP2D6, en diferentes poblaciones Iberoamericanas. De ahí que los estudios presentados en esta Tesis Doctoral marquen el comienzo de una serie de trabajos para estudiar en profundidad la variabilidad de enzimas CYPs en las poblaciones de Iberoamérica, tal y como se ha expuesto en el proyecto MESTIFAR.

Toda la variabilidad del metabolismo incrementado CYP2D6 que se ha mostrado en los estudios del Bloque 2, junto con la evaluación fenotípica de CYP2D6 del Bloque 1 de estudios, cobra importancia a partir del conocimiento de que el fenotipo UM de CYP2D6 influye en las concentraciones plasmáticas de varios fármacos sustratos de esta enzima, como fluoxetina ⁹, tramadol ²³⁹, venlafaxina ²⁴⁰, morfina ¹²⁷ y mirtazapina ²⁴¹, y consecuentemente en la respuesta terapéutica. De hecho, la importancia es tal que incluso la FDA y la EMA han lanzado alertas que restringen el uso de codeína, sustrato de CYP2D6, entre los UMs de CYP2D6 ^{122,123}. Además, los estudios incluidos en el Bloque 3 de esta Tesis Doctoral han pretendido estudiar el impacto clínico del UM CYP2D6 en la vulnerabilidad a la sintomatología de TCAs y su relación con

suicidio y con el abandono del tratamiento antidepresivo, con resultados interesantes.

Los datos obtenidos parecen mostrar que el metabolismo incrementado de CYP2D6 podría influir en la vulnerabilidad a desarrollar síntomas relacionados con la bulimia nerviosa en voluntarias sanas (Estudio VIII), lo que tendría que ver con la implicación de CYP2D6 en el metabolismo endógeno de sustratos como la serotonina ²²⁻²⁴. Así, los resultados del Estudio VIII apoyarían datos anteriores que muestran que la frecuencia de genes activos *CYP2D6* multiplicados es mayor entre los pacientes con TCAs frente a controles sanos ¹⁵⁴.

Pero además, en pacientes con bulimia nerviosa purgativa, el gUM de CYP2D6 podría influir en el riesgo de cometer una tentativa suicida (Estudio IX). En este caso se podría plantear, además de la hipótesis de la influencia de CYP2D6 en el metabolismo endógeno propuesta anteriormente, la idea de que el intento suicida se deba a un fallo en la respuesta al tratamiento recibido por estas pacientes. Puesto que las pacientes con síntomas bulímicos suelen tratarse con el sustrato CYP2D6 fluoxetina ¹⁵⁵, y con este fármaco fueron tratadas las pacientes del Estudio IX, la idea del fallo en el tratamiento cobra sentido y fuerza. Además, los resultados que se obtuvieron en el Estudio X parecen apoyar esta hipótesis. En este caso se comprobó que los pacientes gUMs de CYP2D6 con depresión mayor tratados en monoterapia con sustratos de CYP2D6 (fluoxetina o amitriptilina) abandonaron el tratamiento antidepresivo en las cuatro primeras semanas de seguimiento, posiblemente debido a un fallo terapéutico. Adicionalmente, cabe destacar que ningún gPM de CYP2D6 abandonó el tratamiento durante las 12 semanas de seguimiento de estos pacientes, y se podría pensar que es por una buena respuesta terapéutica al fármaco antidepresivo, y que ningún individuo gPM del Estudio IX intentó suicidarse, lo que está en consonancia con este resultado. Sin embargo, en estos estudios no se analizaron las concentraciones de fármaco o metabolito, ni tampoco se controló la dosis administrada ni la respuesta al tratamiento antidepresivo. Por ello, deben ser realizados más estudios que controlen estas variables a fin de comprobar los resultados que se han expuesto en los estudios del Bloque 3 de la presente Tesis Doctoral. Además, estos estudios deberían llevarse a cabo en poblaciones con diferente origen étnico (en los Estudios VIII, IX y X se evalúan poblaciones Mestizas de Cuba y México). Por otro lado, pero en consonancia con lo expuesto anteriormente, se ha encontrado recientemente una relación entre la alta capacidad metabólica combinada de CYP2D6 y de CYP2C19 y la severidad del intento suicida en una población de Francia que había intentado suicidarse ¹⁸⁰. Así, el estudio de la capacidad metabólica de otras enzimas CYP, como CYP2C19 (enzima que también está implicada en el metabolismo de algunos antidepresivos ^{133,242-244}, que se expresa en el cerebro fetal humano ²⁴⁵ y que podría influir en el desarrollo del

mismo ²⁴⁶) debería tenerse en cuenta a la hora de estudiar la relación CYP2D6 (y potencialmente otros CYPs) y suicido.

Los resultados que se han obtenido en el Bloque 3 de estudios, junto con los reportados en los Bloques 1 y 2, podrían ser relevantes para la implementación de estrategias terapéuticas concretas enfocadas a poblaciones con diferente origen étnico, sin olvidar que son necesarios más estudios en estas y otras poblaciones a fin de corroborar los resultados aquí presentados.

VI. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIÓN GENERAL	119
2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	119

1. CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran la implicación clínica del metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 en la vulnerabilidad a desarrollar síntomas relacionados con trastornos del comportamiento alimentario, en el riesgo de suicidio en pacientes con bulimia nerviosa purgativa y en el abandono del tratamiento antidepresivo. Se demuestra, además, la variabilidad interétnica de estos metabolizadores ultrarrápidos, describiéndose en una alta frecuencia en algunas poblaciones iberoamericanas, principalmente de origen judío y algunas amerindias. Por todo ello se proponen distintas metodologías para su evaluación tanto en voluntarios sanos como en pacientes en tratamiento. En resumen el metabolismo ultrarrápido de CYP2D6 se asocia a factores de riesgo de enfermedad mental y del fallo al tratamiento antidepresivo y es muy frecuente en algunas poblaciones, por lo que parece justificada la necesidad de implantar su evaluación en la clínica, y, por ello, se proponen metodologías para su uso en diferentes situaciones.

2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

BLOQUE 1. FENOTIPO METABÓLICO

Estudio I. Cóctel de fenotipación

I.1. Se ha diseñado un cóctel de fenotipación capaz de medir la capacidad metabólica de las enzimas principales para el metabolismo de fármacos (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4).

Estudio II. CYP2D6 -1584C>G

II.1. La presencia del polimorfismo CYP2D6 -1584G se ha relacionado con un aumento de la capacidad metabólica de CYP2D6, por lo que podría ser importante su inclusión en estudios de farmacogenética.

Estudio III. MR ARI/DARI

III.1. El método de HPLC con detección UV desarrollado fue preciso, exacto, reproducible y adecuado para medir las concentraciones de aripiprazol y dehidroaripiprazol en muestras de plasma humano.

III.2. En pacientes en tratamiento con inhibidores CYP2D6 y un gen activo *CYP2D6* el MR ARI/DARI es mayor, lo que sugiere que este índice metabólico puede ser de utilidad para medir la capacidad hidroxiladora de CYP2D6 en situaciones de interacciones farmacológicas.

BLOQUE 2. VARIABILIDAD INTERÉTNICA

Estudio IV. México

IV.1. El fenotipo metabolizador ultrarrápido de CYP2D6 tiende a ser más abundante en los grupos amerindios de México estudiados que en los mestizos, con una frecuencia mayor en el grupo nativo americano Huichol.

Estudio V. España

V.1. La frecuencia de metabolizadores ultrarrápidos de CYP2D6 en la población española estudiada fue de 5.3%, menor que la publicada previamente.

Estudio VI. Portugal

VI.1. La frecuencia de metabolizadores ultrarrápidos de CYP2D6 en la población portuguesa estudiada fue de 4.7%.

Estudio VII. Iberoamérica

VII.1. Existe variabilidad interétnica en las frecuencias de metabolizadores ultrarrápidos de CYP2D6 en las poblaciones iberoamericanas estudiadas, con una frecuencia hasta dos veces mayor en los judíos Ashkenazi (11.6%) que en las poblaciones con otros orígenes étnicos.

BLOQUE 3. IMPLICACIONES CLÍNICAS EN SALUD MENTAL

Estudio VIII. Riesgo TCAs

VIII.1. El fenotipo metabolizador ultrarrápido de CYP2D6 se ha asociado con el riesgo a desarrollar síntomas relacionados con TCAs en la población de Cuba estudiada.

Estudio IX. Suicidio TCAs

IX.2. Los metabolizadores ultrarrápidos de CYP2D6 fueron más frecuentes en aquellos pacientes diagnosticados con bulimia nerviosa purgativa y con historia de tentativa suicida que en el resto.

Estudio X. Discontinuación antidepresivos

X.1. Los metabolizadores ultrarrápidos de CYP2D6 tienen más riesgo de abandonar el tratamiento en monoterapia con fluoxetina o amitriptilina que el resto de individuos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 European Medicines Agency. Note for guidance on definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories (EMA/CHMP/ICH/437986/2006). 2007. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002880.pdf. Consultada en Junio de 2015
- 2 Llerena A, Berez R, Dorado P, de la Rubia A. QTc interval, CYP2D6 and CYP2C9 genotypes and risperidone plasma concentrations. *J Psychopharmacol* 2004; **18**: 189–93.
- 3 Dorado P, Berez R, Penas-Lledo EM, Caceres MC, Llerena A. Clinical implications of CYP2D6 genetic polymorphism during treatment with antipsychotic drugs. *Curr Drug Targets* 2006; **7**: 1671–80.
- 4 Catalano J, Hawkins TB, Wang J, Jawaid A, Fox JC, Hong H. CYP2D6 genotype predicts tamoxifen side effects but not cancer-free or survival benefits in postmenopausal ER+ and/or PgR+ breast cancers. *Pharmacogenomics* 2013; **14**: 462–3.
- 5 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.
- 6 Llerena A, Alvarez M, Dorado P, Gonzalez I, Penas-Lledo E, Perez B *et al*. Interethnic differences in the relevance of CYP2C9 genotype and environmental factors for diclofenac metabolism in Hispanics from Cuba and Spain. *Pharmacogenomics J* 2014; **14**: 229–34.
- 7 Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005; **5**: 6–13.
- 8 Teh LK, Bertilsson L. Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; **27**: 55–67.
- 9 Llerena A, Dorado P, Berez R, Gonzalez AP, Penas-Lledo EM. Effect of CYP2D6 and CYP2C9 genotypes on fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during steady-state conditions. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **59**: 869–73.
- 10 Dorado P, López-Torres E, Peñas-Lledó EM, Martínez-Antón J, Llerena A. Neurological toxicity after phenytoin infusion in a pediatric patient with epilepsy: influence of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB1 genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 2013; **13**: 359–61.
- 11 Flórez J. *Farmacología Humana*. MASSON, 2013.
- 12 Stingl JC, Brockmüller J, Viviani R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Mol Psychiatry* 2013; **18**: 273–87.

VII. Bibliografia

- 13 Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ *et al.* The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*; **8**: 1–13.
- 14 Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; **22**: 1–21.
- 15 Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1992; **13**: 346–52.
- 16 Cholerton S, Daly AK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci* 1992; **13**: 434–9.
- 17 Wang J-F, Chou K-C. Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2010; **11**: 342–6.
- 18 Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, 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.
- 19 Miksys SL, Tyndale RF. Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J Psychiatry Neurosci* 2002; **27**: 406–15.
- 20 Dutheil F, Dauchy S, Diry M, Sazdovitch V, Cloarec O, Mellottée L *et al.* Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab Dispos* 2009; **37**: 1528–38.
- 21 Llerena A, Dorado P, Penas-Lledo EM. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 17–28.
- 22 Yu A-M, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Küpfer A, Gonzalez FJ. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 173–81.
- 23 Ozdemir V, Gunes A, Dahl M-L, Scordo MG, Williams-Jones B, Someya T. Could endogenous substrates of drug-metabolizing enzymes influence constitutive physiology and drug target responsiveness? *Pharmacogenomics* 2006; **7**: 1199–210.
- 24 Ozdemir V, Bertilsson L, Miura J, Carpenter E, Reist C, Harper P *et al.* CYP2D6 genotype in relation to perphenazine concentration and pituitary pharmacodynamic tissue sensitivity in Asians: CYP2D6-serotonin-dopamine crosstalk revisited. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 339–47.
- 25 Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **83**: 234–42.

- 26 Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osikowska-Evers BO, Tieves G, Zekorn C *et al.* Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol* 1987; **23**: 455–8.
- 27 Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 889–904.
- 28 Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 1992; **14**: 49–58.
- 29 The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database: CYP2D6. 2015. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>. Consultada en Junio de 2015
- 30 Llerena A, Dorado P, Ramirez R, Gonzalez I, Alvarez M, Penas-Lledo EM *et al.* CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J* 2012; **12**: 176–83.
- 31 Zhou S-F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2009; **48**: 689–723.
- 32 Ciszowski C, Madadi P, Phillips MS, Lauwers AE, Koren G. Codeine, ultrarapid-metabolism genotype, and postoperative death. *N Engl J Med* 2009; **361**: 827–8.
- 33 Kelly LE, Rieder M, van den Anker J, Malkin B, Ross C, Neely MN *et al.* More codeine fatalities after tonsillectomy in North American children. *Pediatrics* 2012; **129**: e1343–7.
- 34 Berecz R, de la Rubia A, Dorado P, Fernandez-Salguero P, Dahl ML, Llerena A. Thioridazine steady-state plasma concentrations are influenced by tobacco smoking and CYP2D6, but not by the CYP2C9 genotype. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **59**: 45–50.
- 35 Llerena A, de la Rubia A, Berecz R, Dorado P. Relationship between haloperidol plasma concentration, debrisoquine metabolic ratio, CYP2D6 and CYP2C9 genotypes in psychiatric patients. *Pharmacopsychiatry* 2004; **37**: 69–73.
- 36 Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M *et al.* Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 573–85.
- 37 Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977; **2**: 584–6.
- 38 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**: 102–105.
- 39 Eichelbaum M, Spannbrücker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; **16**: 183–7.

- 40 Eichelbaum M, Bertilsson L, Säwe J, Zekorn C. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther* 1982; **31**: 184–6.
- 41 Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin H V *et al.* Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics* 1988; **2**: 174–9.
- 42 Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW *et al.* Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988; **331**: 442–6.
- 43 Küpfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984; **26**: 753–9.
- 44 Wrighton SA, Stevens JC, Becker GW, VandenBranden M. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 1993; **306**: 240–5.
- 45 Hicks JK, Swen JJ, Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr Drug Metab* 2014; **15**: 218–32.
- 46 Jerling M, Bertilsson L, Sjöqvist F. The use of therapeutic drug monitoring data to document kinetic drug interactions: an example with amitriptyline and nortriptyline. *Ther Drug Monit* 1994; **16**: 1–12.
- 47 Llerena A, Berecz R, de la Rubia A, Norberto MJ, Benítez J. Use of the mesoridazine/thioridazine ratio as a marker for CYP2D6 enzyme activity. *Ther Drug Monit* 2000; **22**: 397–401.
- 48 Berecz R, Llerena A, de la Rubia A, Gómez J, Kellermann M, Dorado P *et al.* Relationship between risperidone and 9-hydroxy-risperidone plasma concentrations and CYP2D6 enzyme activity in psychiatric patients. *Pharmacopsychiatry* 2002; **35**: 231–4.
- 49 Llerena A, Edman G, Cobaleda J, Benitez J, Schalling D, Bertilsson L. Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6. *Acta Psychiatr Scand* 1993; **87**: 23–8.
- 50 Pelkonen O, Rautio A, Raunio H. Specificity and applicability of probes for drug metabolizing enzymes. In: *COST B1 conference on variability and specificity in drug metabolism*. Office for official Publications of the European Communities, 1995, pp 147–58.
- 51 Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; **63**: 321–33.
- 52 Brosen K. Sparteine oxidation polymorphism in Greenlanders living in Denmark. *Br J Clin Pharmacol* 1986; **22**: 415–9.

- 53 al-Hadidi HF, Irshaid YM, Rawashdeh NM. Metoprolol alpha-hydroxylation is a poor probe for debrisoquine oxidation (CYP2D6) polymorphism in Jordanians. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; **47**: 311–4.
- 54 McGourty JC, Silas JH, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism--population and family studies. *Br J Clin Pharmacol* 1985; **20**: 555–66.
- 55 Schmid B, Bircher J, Preisig R, Kupfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: cosegregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 1985; **38**: 618–24.
- 56 He N, Daniel HI, Hajiloo L, Shockley D. Dextromethorphan O-demethylation polymorphism in an African-American population. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; **55**: 457–9.
- 57 Jackson PR, Tucker GT, Woods HF. Testing for bimodality in frequency distributions of data suggesting polymorphisms of drug metabolism--hypothesis testing. *Br J Clin Pharmacol* 1989; **28**: 655–62.
- 58 Silverman B. Using Kernel Density Estimates to investigate Multimodality. *J Roy Stat Soc* 1981; **43**: 97–9.
- 59 Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F, Sjoqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **274**: 516–20.
- 60 Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K *et al.* Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 1998; **8**: 15–26.
- 61 Montané Jaime LK, Lalla A, Steimer W, Gaedigk A, Montane Jaime LK, Lalla A *et al.* Characterization of the CYP2D6 gene locus and metabolic activity in Indo- and Afro-Trinidadians: discovery of novel allelic variants. *Pharmacogenomics* 2013; **14**: 261–76.
- 62 Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S *et al.* The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 815–32.
- 63 Tanaka E, Kurata N, Yasuhara H. How useful is the 'cocktail approach' for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo? *J Clin Pharm Ther* 2003; **28**: 157–65.
- 64 Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug 'Pittsburgh cocktail' approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**: 365–76.
- 65 Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A *et al.* Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2,

- and xanthine oxidase with the 'Cooperstown cocktail'. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **68**: 375–83.
- 66 Blakey GE, Lockton JA, Perrett J, Norwood P, Russell M, Aherne Z *et al*. Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of a five-probe metabolic cocktail for CYPs 1A2, 3A4, 2C9, 2D6 and 2E1. *Br J Clin Pharmacol* 2004; **57**: 162–9.
- 67 Tomalik-Scharte D, Jetter A, Kinzig-Schippers M, Skott A, Sörgel F, Klaassen T *et al*. Effect of propiverine on cytochrome P450 enzymes: a cocktail interaction study in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 1859–66.
- 68 Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y *et al*. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol* 2009; **68**: 928–35.
- 69 LLerena A, Berecz R, Dorado P, de la Garza CS, Norberto MJ, Cáceres M *et al*. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of CYP2D6 drug interactions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; **783**: 213–9.
- 70 LLerena A, Berecz R, de la Rubia A, Fernández-Salguero P, Dorado P. Effect of thioridazine dosage on the debrisoquine hydroxylation phenotype in psychiatric patients with different CYP2D6 genotypes. *Ther Drug Monit* 2001; **23**: 616–20.
- 71 Villagra D, Goethe J, Schwartz HI, Szarek B, Kocherla M, Gorowski K *et al*. Novel drug metabolism indices for pharmacogenetic functional status based on combinatory genotyping of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 genes. *Biomark Med* 2011; **5**: 427–38.
- 72 Ruano G, Villagra D, Szarek B, Windemuth A, Kocherla M, Gorowski K *et al*. Physiogenomic analysis of CYP450 drug metabolism correlates dyslipidemia with pharmacogenetic functional status in psychiatric patients. *Biomark Med* 2011; **5**: 439–49.
- 73 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; **369**: 23–37.
- 74 Casner PR. The effect of CYP2D6 polymorphisms on dextromethorphan metabolism in Mexican Americans. *J Clin Pharmacol* 2005; **45**: 1230–5.
- 75 Sosa-Macias M, Dorado P, Alanis-Banuelos RE, Llerena A, Lares-Asseff I. Influence of CYP2D6 deletion, multiplication, -1584C-->G, 31G-->A and 2988G-->a gene polymorphisms on dextromethorphan metabolism among Mexican tepehuanos and mestizos. *Pharmacology* 2010; **86**: 30–6.
- 76 Dorado P, Heras N, Machin E, Hernandez F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; **68**: 637–44.

- 77 Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 284–95.
- 78 Chou WH, Yan FX, Robbins-Weilert DK, Ryder TB, Liu WW, Perbost C *et al.* Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. *Clin Chem* 2003; **49**: 542–51.
- 79 Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 11825–9.
- 80 Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **278**: 441–6.
- 81 Wennerholm A, Johansson I, Massele AY, Lande M, Alm C, Aden-Abdi Y *et al.* Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 707–14.
- 82 Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 715–23.
- 83 Gaedigk A, Bradford LD, Marcucci KA, Leeder JS. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**: 76–89.
- 84 Lopez M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**: 749–54.
- 85 Gaedigk A, Ryder DL, Bradford LD, Leeder JS. CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584G promoter polymorphism. *Clin Chem* 2003; **49**: 1008–11.
- 86 Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese E-U, Eichelbaum M *et al.* A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 128–38.
- 87 Luo HR, Gaedigk A, Aloumanis V, Wan YJ. Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**: 797–802.
- 88 Løvlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM. Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 45–55.

- 89 Dorado P, Peñas-Lledó EM, de la Rubia A, Llerena A, Penas-Lledo EM, de la Rubia A *et al.* Relevance of CYP2D6 -1584C>G polymorphism for thioridazine:mesoridazine plasma concentration ratio in psychiatric patients. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 1083–9.
- 90 Allorge D, Harlow J, Boulet O, Hayhurst GP, Chowdry J, Roth E *et al.* In-vitro analysis of the contribution of CYP2D6.35 to ultra-rapid metabolism. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 739–41.
- 91 McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* 1997; **7**: 187–91.
- 92 Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; **31**: 184–90.
- 93 Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W *et al.* Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004572.
- 94 Sandoval K, Buentello-Malo L, Peñaloza-Espinosa R, Avelino H, Salas A, Calafell F *et al.* Linguistic and maternal genetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Hum Genet* 2009; **126**: 521–31.
- 95 Agúndez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **57**: 265–9.
- 96 Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl ML *et al.* Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 657–60.
- 97 Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Gesteira A, Barros F *et al.* Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 1457–66.
- 98 Céspedes-Garro C, Jiménez-Arce G, Naranjo M-EGEG, Barrantes R, Llerena A, RIBEF CFC of the I-AN of P *et al.* Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans. *Int J Trop Biol Conserv* 2014; **Referres 2**: 1659–71.
- 99 Céspedes-Garro C, Naranjo M-EG, Ramírez R, Serrano V, Fariñas H, Barrantes R *et al.* Pharmacogenetics in Central American healthy volunteers: interethnic variability. *Drug Metabol Drug Interact* 2014. doi:10.1515/dmdi-2014-0025.
- 100 Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 93–101.

- 101 López-López M, Peñas-Lledó E, Dorado P, Ortega A, Corona T, Ochoa A *et al.* CYP2D6 genetic polymorphisms in Southern Mexican Mayan Lacandones and Mestizos from Chiapas. *Pharmacogenomics* 2014; **15**: 1859–65.
- 102 Perez-Paramo YX, Hernandez-Cabrera F, Dorado P, Llerena A, Muñoz-Jimenez S, Ortiz-Lopez R *et al.* Interethnic relationships of CYP2D6 variants in native and Mestizo populations sharing the same ecosystem. *Pharmacogenomics* 2015; **16**: 703–12.
- 103 Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct* 2006; **24**: 381–5.
- 104 Correia C, Santos P, Coutinho AM, Vicente AM. Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample. *Cell Biochem Funct* 2009; **27**: 251–5.
- 105 Isaza CA, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; **22**: 695–705.
- 106 Contreras A V, Monge-Cazares T, Alfaro-Ruiz L, Hernandez-Morales S, Miranda-Ortiz H, Carrillo-Sanchez K *et al.* Resequencing, haplotype construction and identification of novel variants of CYP2D6 in Mexican Mestizos. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 745–56.
- 107 Mendoza R, Wan YJ, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N *et al.* CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 552–60.
- 108 Penas-Lledo EM, Llerena A. CYP2D6 variation, behaviour and psychopathology: implications for pharmacogenomics-guided clinical trials. *Br J Clin Pharmacol* 2014; **77**: 673–83.
- 109 Llerena A, Berez R, de la Rubia A, Dorado P. QTc interval lengthening and debrisoquine metabolic ratio in psychiatric patients treated with oral haloperidol monotherapy. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; **58**: 223–4.
- 110 Penas-Lledo EM, Trejo HD, Dorado P, Ortega A, Jung H, Alonso E *et al.* CYP2D6 ultrarapid metabolism and early dropout from fluoxetine or amitriptyline monotherapy treatment in major depressive patients. *Mol Psychiatry* 2013; **18**: 8–9.
- 111 Kawanishi C, Lundgren S, Agren H, Bertilsson L. Increased incidence of CYP2D6 gene duplication in patients with persistent mood disorders: ultrarapid metabolism of antidepressants as a cause of nonresponse. A pilot study. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **59**: 803–7.
- 112 Rau T, Wohlleben G, Wuttke H, Thuerauf N, Lunkenheimer J, Lanczik M *et al.* CYP2D6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants—a pilot study. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 386–93.

VII. Bibliografía

- 113 Fux R, Mörike K, Pröhmer AMT, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E *et al.* Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**: 378–87.
- 114 Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; **64**: 1163–73.
- 115 Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M *et al.* Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther* 2009; **85**: 269–72.
- 116 Wojtczak A, Wojtczak M, Skrętkowicz J. The relationship between plasma concentration of metoprolol and CYP2D6 genotype in patients with ischemic heart disease. *Pharmacol Rep* 2014; **66**: 511–4.
- 117 Haufroid V, Hantson P. CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amphetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clin Toxicol (Phila)* 2015; : 1–10.
- 118 Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci* 2007; **96**: 2224–31.
- 119 Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A *et al.* Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **80**: 61–74.
- 120 Research C for DE and. Genomics - Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling.
<http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>. Consultada en Junio de 2015
- 121 European Medicines Agency -European public assessment reports.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Consultada en Junio de 2015
- 122 FDA. Prescribing Information about Codeine. 2013
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022402s006lbl.pdf. Consultada en Junio de 2015
- 123 EMA. Codeine-containing medicinal products for the treatment of cough or cold in paediatric patients. 2015
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Codeine_cough_or_cold_in_children/Position_provided_by_CMDh/WC500186159.pdf. Consultada en Junio de 2015
- 124 Desmeules J, Gascon MP, Dayer P, Magistris M. Impact of environmental and genetic factors on codeine analgesia. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; **41**: 23–6.

- 125 Hedenmalm K, Sundgren M, Granberg K, Spigset O, Dahlqvist R. Urinary excretion of codeine, ethylmorphine, and their metabolites: relation to the CYP2D6 activity. *Ther Drug Monit* 1997; **19**: 643–9.
- 126 Eckhardt K, Li S, Ammon S, Schänzle G, Mikus G, Eichelbaum M. Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain* 1998; **76**: 27–33.
- 127 Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen J-THA, Lötsch J, Roots I *et al.* Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics J* 2007; **7**: 257–65.
- 128 Heintze K, Fuchs W. Codeine Ultra-rapid Metabolizers: Age Appears to be a Key Factor in Adverse Effects of Codeine. *Drug Res (Stuttg)* 2015. doi:10.1055/s-0034-1396885.
- 129 Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P *et al.* Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2827–31.
- 130 Lazaryan M, Shasha-Zigelman C, Dagan Z, Berkovitch M. Codeine should not be prescribed for breastfeeding mothers or children under the age of 12. *Acta Paediatr* 2015; **104**: 550–6.
- 131 Madadi P, Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder JS *et al.* Safety of codeine during breastfeeding: fatal morphine poisoning in the breastfed neonate of a mother prescribed codeine. *Can Fam Physician* 2007; **53**: 33–5.
- 132 Hicks JK, Swen JJ, Thorn CF, Sangkuhl K, Kharasch ED, Ellingrod VL *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2013; **93**: 402–8.
- 133 Hicks JK, Bishop JR, Sangkuhl K, Müller DJ, Ji Y, Leckband SG *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 2015. doi:10.1002/cpt.147.
- 134 Chua EW, Foulds J, Miller AL, Kennedy MA. Novel CYP2D6 and CYP2C19 variants identified in a patient with adverse reactions towards venlafaxine monotherapy and dual therapy with nortriptyline and fluoxetine. *Pharmacogenet Genomics* 2013; **23**: 494–7.
- 135 Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J *et al.* Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem* 2005; **51**: 376–85.
- 136 Shapiro JR, Berkman ND, Brownley KA, Sedway JA, Lohr KN, Bulik CM. Bulimia nervosa treatment: a systematic review of randomized controlled trials. *Int J Eat Disord* 2007; **40**: 321–36.

- 137 Kriston L, von Wolff A, Westphal A, Hölzel LP, Härter M. Efficacy and acceptability of acute treatments for persistent depressive disorder: a network meta-analysis. *Depress Anxiety* 2014; **31**: 621–30.
- 138 Peñas-Lledó E, Fernández-Aranda F, Jiménez-Murcia S, Granero R, Penelo E, Soto A *et al.* Subtyping eating disordered patients along drive for thinness and depression. *Behav Res Ther* 2009; **47**: 513–9.
- 139 Papakostas GI, Charles D, Fava M. Are typical starting doses of the selective serotonin reuptake inhibitors sub-optimal? A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies in major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry* 2010; **11**: 300–7.
- 140 Bijl MJ, Visser LE, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker BHC *et al.* Influence of the CYP2D6*4 polymorphism on dose, switching and discontinuation of antidepressants. *Br J Clin Pharmacol* 2008; **65**: 558–64.
- 141 Hansen HV, Kessing LV. Adherence to antidepressant treatment. *Expert Rev Neurother* 2007; **7**: 57–62.
- 142 Snider NT, Sikora MJ, Sridar C, Feuerstein TJ, Rae JM, Hollenberg PF. The endocannabinoid anandamide is a substrate for the human polymorphic cytochrome P450 2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **327**: 538–45.
- 143 Sridar C, Snider NT, Hollenberg PF. Anandamide oxidation by wild-type and polymorphically expressed CYP2B6 and CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 782–8.
- 144 Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S *et al.* Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 2004; **145**: 699–705.
- 145 Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 838–43.
- 146 Kirchheiner J, Henckel H-B, Franke L, Meineke I, Tzvetkov M, Uebelhack R *et al.* Impact of the CYP2D6 ultra-rapid metabolizer genotype on doxepin pharmacokinetics and serotonin in platelets. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**: 579–87.
- 147 González I, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Dorado P, Alvarez M, Llerena A *et al.* Relation between CYP2D6 phenotype and genotype and personality in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 2008; **9**: 833–40.
- 148 Penas-Lledo EM, Dorado P, Pacheco R, Gonzalez I, Llerena A. Relation between CYP2D6 genotype, personality, neurocognition and overall psychopathology in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 1111–20.
- 149 Llerena A, Dorado P, Penas-Lledo EM, Caceres MC, De la Rubia A. Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients. *Pharmacogenomics J* 2007; **7**: 408–10.

- 150 Peñas-Lledó EM, Dorado P, Llerena A. Pharmacogenomics and personality: Role of CYP2D6 and implications for psychopathology. *Adv Biol Psychiatry* 2010; **25**: 30–45.
- 151 Stingl JC, Esslinger C, Tost H, Bilek E, Kirsch P, Ohmle B *et al.* Genetic variation in CYP2D6 impacts neural activation during cognitive tasks in humans. *Neuroimage* 2012; **59**: 2818–23.
- 152 Kirchheiner J, Seeringer A, Godoy AL, Ohmle B, Maier C, Beschoner P *et al.* CYP2D6 in the brain: genotype effects on resting brain perfusion. *Mol Psychiatry* 2011; **16**: 237, 333–41.
- 153 Blasco-Fontecilla H, Peñas-Lledó E, Vaquero-Lorenzo C, Dorado P, Saiz-Ruiz J, Llerena A *et al.* CYP2D6 polymorphism and mental and personality disorders in suicide attempters. *J Pers Disord* 2014; **28**: 873–83.
- 154 Penas-Lledo EM, Dorado P, Aguera Z, Gratacos M, Estivill X, Fernandez-Aranda F *et al.* CYP2D6 polymorphism in patients with eating disorders. *Pharmacogenomics J* 2012; **12**: 173–5.
- 155 Jackson CW, Cates M, Lorenz R. Pharmacotherapy of eating disorders. *Nutr Clin Pract* 2010; **25**: 143–59.
- 156 Peterson CB, Swanson SA, Crow SJ, Mitchell JE, Agras WS, Halmi KA *et al.* Longitudinal stability of binge-eating type in eating disorders. *Int J Eat Disord* 2012; **45**: 664–9.
- 157 Penas-Lledo EM, Dorado P, Aguera Z, Gratacos M, Estivill X, Fernandez-Aranda F *et al.* High risk of lifetime history of suicide attempts among CYP2D6 ultrarapid metabolizers with eating disorders. *Mol Psychiatry* 2011; **16**: 691–2.
- 158 Zackrisson AL, Lindblom B, Ahlner J. High frequency of occurrence of CYP2D6 gene duplication/multiduplication indicating ultrarapid metabolism among suicide cases. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **88**: 354–9.
- 159 Stingl JC, Viviani R. CYP2D6 in the brain: impact on suicidality. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **89**: 352–3.
- 160 Penas-Lledo EM, Blasco-Fontecilla H, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Baca-Garcia E, Llerena A. CYP2D6 and the severity of suicide attempts. *Pharmacogenomics* 2012; **13**: 179–84.
- 161 Höfer P, Schosser A, Calati R, Serretti A, Massat I, Kocabas NA *et al.* The impact of Cytochrome P450 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 genes on suicide attempt and suicide risk—a European multicentre study on treatment-resistant major depressive disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2013; **263**: 385–91.
- 162 Christensen M, Andersson K, Dalén P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A *et al.* The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**: 517–28.

- 163 Scott RJ, Palmer J, Lewis IA, Pleasance S. Determination of a 'GW cocktail' of cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in plasma and urine using automated solid phase extraction and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999; **13**: 2305–19.
- 164 Schumock GT, Li EC, Suda KJ, Wiest MD, Stubbings J, Matusiak LM *et al.* National trends in prescription drug expenditures and projections for 2015. *Am J Health Syst Pharm* 2015; **72**: 717–36.
- 165 Bernardo M, Coma A, Ibáñez C, Zara C, Bari JM, Serrano-Blanco A. Antipsychotic polypharmacy in a regional health service: a population-based study. *BMC Psychiatry* 2012; **12**: 42.
- 166 Jaracz J, Tetera-Rudnicka E, Kujath D, Raczyńska A, Stoszek S, Czernaś W *et al.* The prevalence of antipsychotic polypharmacy in schizophrenic patients discharged from psychiatric units in Poland. *Pharmacol Rep* 2014; **66**: 613–7.
- 167 Kroken RA, Johnsen E, Ruud T, Wentzel-Larsen T, Jørgensen HA. Treatment of schizophrenia with antipsychotics in Norwegian emergency wards, a cross-sectional national study. *BMC Psychiatry* 2009; **9**: 24.
- 168 Degli Esposti L, Sangiorgi D, Mencacci C, Spina E, Pasina C, Alacqua M *et al.* Pharmac utilisation and related costs of drugs used to treat schizophrenia and bipolar disorder in Italy: the IBIS study. *BMC Psychiatry* 2014; **14**: 282.
- 169 Dorado P, Caceres MC, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J, Llerena A. Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques* 2005; **39**: 571–4.
- 170 Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 1999; **226**: 327–38.
- 171 Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem* 2000; **46**: 1072–7.
- 172 Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR *et al.* Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995; **5**: 215–23.
- 173 Garner D, Olmstead M, Polivy J. Development and validation of a multi-dimensional Eating Disorder Inventory for Anorexia Nervosa and Bulimia. *Int J Eat Disord* 1983; **2**: 15–34.
- 174 Garner D, Olmstead M. *The Eating Disorder Inventory (E.D.I.) Manual*. Psychological Assessment Resources Inc.: Odessa (FL), 1984.

- 175 Guimerá E, Querol E, Torrubia Beltri R. Adaptacion española del Eating Disorder Inventory (EDI) en una muestra de pacientes anoréxicas. *An Psiquiatr* 1987; **3**: 185–90.
- 176 Garner D. *Eating Disorder Inventory-3 Professional Manual*. Psychological Assessment Resources, Inc, 2004.
- 177 Meltzer LJ, Johnson SB, Prine JM, Banks RA, Desrosiers PM, Silverstein JH. Disordered eating, body mass, and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; **24**: 678–82.
- 178 Fan Y, Li Y, Liu A, Hu X, Ma G, Xu G. Associations between body mass index, weight control concerns and behaviors, and eating disorder symptoms among non-clinical Chinese adolescents. *BMC Public Health* 2010; **10**: 314.
- 179 Machado PPP, Calaldo Otero M, Gonçalves SF, Martins C, Lameiras Fernández M. Eating related problems amongst Iberian female college students. *Int. J. Clin. Heal. Psychol.* 2004; **4**: 495–504.
- 180 Penas-Lledo E, Guillaume S, Naranjo ME, Delgado A, Jausent I, Blasco-Fontecilla H *et al*. A combined high CYP2D6-CYP2C19 metabolic capacity is associated with the severity of suicide attempt as measured by objective circumstances. *Pharmacogenomics J* 2014. doi:10.1038/tpj.2014.42 [doi].
- 181 Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E *et al*. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the 'Cooperstown 5+1 cocktail'. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **74**: 437–47.
- 182 Yin OQP, Lam SSL, Lo CMY, Chow MSS. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; **18**: 2921–33.
- 183 Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ *et al*. Development of the 'Inje cocktail' for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2007; **82**: 531–40.
- 184 Petsalo A, Turpeinen M, Pelkonen O, Tolonen A. Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing sub 2 microm particle size column. *J Chromatogr A* 2008; **1215**: 107–15.
- 185 Ghassabian S, Chetty M, Tattam BN, Chem MC, Glen J, Rahme J *et al*. A high-throughput assay using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous in vivo phenotyping of 5 major cytochrome p450 enzymes in patients. *Ther Drug Monit* 2009; **31**: 239–46.
- 186 Wohlfarth A, Naue J, Lutz-Bonengel S, Dresen S, Auwärter V. Cocktail approach for in vivo phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: development of an effective sampling,

- extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping. *J Clin Pharmacol* 2012; **52**: 1200–14.
- 187 Oh K-S, Park S-J, Shinde DD, Shin J-G, Kim D-H. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; **895-896**: 56–64.
- 188 Zhu B, Ou-Yang DS, Chen XP, Huang SL, Tan ZR, He N *et al*. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 455–61.
- 189 Sharma A, Pilote S, Bélanger PM, Arsenault M, Hamelin BA. A convenient five-drug cocktail for the assessment of major drug metabolizing enzymes: a pilot study. *Br J Clin Pharmacol* 2004; **58**: 288–97.
- 190 Zgheib NK, Frye RF, Tracy TS, Romkes M, Branch RA. Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **80**: 257–63.
- 191 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.
- 192 Streetman DS, Bertino Jr JS, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 2000; **10**: 187–216.
- 193 Pedersen RS, Damkier P, Christensen MMH, Brosen K. A cytochrome P450 phenotyping cocktail causing unexpected adverse reactions in female volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; **69**: 1997–9.
- 194 Schadel M, Wu D, Otton S V, Kalow W, Sellers EM. Pharmacokinetics of dextromethorphan and metabolites in humans: influence of the CYP2D6 phenotype and quinidine inhibition. *J Clin Psychopharmacol* 1995; **15**: 263–9.
- 195 Tateishi T, Chida M, Ariyoshi N, Mizorogi Y, Kamataki T, Kobayashi S. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **65**: 570–5.
- 196 Chládek J, Zimová G, Martínková J, Tůma I. Intra-individual variability and influence of urine collection period on dextromethorphan metabolic ratios in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; **13**: 508–15.
- 197 Chládek J, Zimová G, Beránek M, Martínková J. In-vivo indices of CYP2D6 activity: comparison of dextromethorphan metabolic ratios in 4-h urine and 3-h plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; **56**: 651–7.
- 198 Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, Hall SD. Quantification of dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; **678**: 105–11.

- 199 Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; **678**: 113–28.
- 200 Takashima T, Murase S, Iwasaki K, Shimada K. Evaluation of dextromethorphan metabolism using hepatocytes from CYP2D6 poor and extensive metabolizers. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; **20**: 177–82.
- 201 Yu A, Haining RL. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 1514–20.
- 202 Zhang Y, Blouin RA, McNamara PJ, Steinmetz J, Wedlund PJ. Limitation to the use of the urinary S-/R-mephenytoin ratio in pharmacogenetic studies. *Br J Clin Pharmacol* 1991; **31**: 350–2.
- 203 Miners JO, Birkett DJ. Use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic cytochrome P450 2C9. *Methods Enzymol* 1996; **272**: 139–45.
- 204 Dorado P, Berecz R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, Llerena A. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **59**: 221–25.
- 205 Dorado P, Berecz R, Caceres MC, Llerena A. Analysis of diclofenac and its metabolites by high-performance liquid chromatography: relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. *J Chromatogr Anal Technol Biomed life Sci* 2003; **789**: 437–42.
- 206 Dorado P, Berecz R, Caceres MC, Conzalez I, Llerena A. Reproducibility over time of the urinary diclofenac/4'-OH diclofenac ratio among different CYP2C9 genotypes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003; **28**: 213–15.
- 207 Yasar U, Eliasson E, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Gadd M, Sjöqvist F *et al.* The role of CYP2C9 genotype in the metabolism of diclofenac in vivo and in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; **57**: 729–35.
- 208 Morin S, Lorient MA, Poirier JM, Tenneze L, Beaune PH, Funck-Brentano C *et al.* Is diclofenac a valuable CYP2C9 probe in humans? *Eur J Clin Pharmacol*; **56**: 793–7.
- 209 Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjöqvist F *et al.* Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**: 89–98.
- 210 Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, Eliasson E, Dahl M-L, Kayaalp SO *et al.* CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **60**: 337–42.

- 211 Dorado P, Beltran LJ, Machin E, Penas-Lledo EM, Teran E, Llerena A *et al.* Losartan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population: influence of CYP2C9 genetic polymorphism, habits and gender. *Pharmacogenomics* 2012; **13**: 1711–7.
- 212 Lancelin F, Djebrani K, Tabaouti K, Kraoul L, Brovedani S, Paubel P *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; **867**: 15–9.
- 213 Akamine Y, Yasui-Furukori N, Kojima M, Inoue Y, Uno T. A sensitive column-switching HPLC method for aripiprazole and dehydroaripiprazole and its application to human pharmacokinetic studies. *J Sep Sci* 2010; **33**: 3292–8.
- 214 Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K *et al.* AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; **44**: 195–235.
- 215 Hendset M, Hermann M, Lunde H, Refsum H, Molden E. Impact of the CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; **63**: 1147–51.
- 216 Kirschbaum KM, Müller MJ, Malevani J, Mobascher A, Burchardt C, Piel M *et al.* Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry* 2008; **9**: 212–8.
- 217 Gründer G, Fellows C, Janouschek H, Veselinovic T, Boy C, Bröcheler A *et al.* Brain and plasma pharmacokinetics of aripiprazole in patients with schizophrenia: an [18F]fallypride PET study. *Am J Psychiatry* 2008; **165**: 988–95.
- 218 Fohner A, Muzquiz LI, Austin MA, Gaedigk A, Gordon A, Thornton T *et al.* Pharmacogenetics in American Indian populations: analysis of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C9 in the Confederated Salish and Kootenai Tribes. *Pharmacogenet Genomics* 2013; **23**: 403–14.
- 219 Fonne-Pfister R, Meyer UA. Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450 function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 3829–35.
- 220 Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramisak I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J* 2003; **44**: 425–28.
- 221 Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A *et al.* Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; **21**: 419–26.
- 222 Rideg O, Haber A, Botz L, Szucs F, Varnai R, Miseta A *et al.* Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6, CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms in the Hungarian population. *Cell Biochem Funct* 2011; **29**: 562–8.

- 223 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.
- 224 Riccardi LN, Lanzelotto R, Luiselli D, Ceccardi S, Falconi M, Bini C *et al.* CYP2D6 genotyping in natives and immigrants from the Emilia-Romagna Region (Italy). *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; **15**: 801–6.
- 225 Buzkova H, Pechandova K, Slanar O, Perlik F. Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct* 2008; **26**: 76–81.
- 226 Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K *et al.* 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.
- 227 Rebsamen MC, Desmeules J, Daali Y, Chiappe A, Diemand A, Rey C *et al.* The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction. *Pharmacogenomics J* 2009; **9**: 34–41.
- 228 Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T *et al.* Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 185–92.
- 229 Gaedigk A, Hernandez J, García-Solaesa V, Sánchez S, Isidoro-García M. Detection and characterization of the CYP2D6*9x2 gene duplication in two Spanish populations: resolution of AmpliChip CYP450 test no-calls. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1617–22.
- 230 CYP2D6 pharmacogenomics of tamoxifen treatment. *Technol Eval Cent Assess Program Exec Summ* 2014; **28**: 1–4.
- 231 Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Erazo M, Desnick RJ. CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 allele frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Pharmacogenomics* 2007; **8**: 721–30.
- 232 Cintado A, Companioni O, Nazabal M, Camacho H, Ferrer A, De Cossio MEF *et al.* Admixture estimates for the population of Havana City. *Ann Hum Biol* 2009; **36**: 350–60.
- 233 Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschøn HN, Demontis D *et al.* Cuba: exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004488.
- 234 Bortolini MC, Weimer T de A, Salzano FM, Callegari-Jacques SM, Schneider H, Layrisse Z *et al.* Evolutionary relationships between black South American and African populations. *Hum Biol* 1995; **67**: 547–59.
- 235 Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and

- Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 217–28.
- 236 De Andres F, Sosa-Macias M, Llerena A. A rapid and simple LC-MS/MS method for the simultaneous evaluation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 hydroxylation capacity. *Bioanalysis* 2014; **6**: 683–96.
- 237 Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007; **116**: 496–526.
- 238 RIBEF · Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica. <http://www.ribef.com/index.php>. Consultada en Junio de 2015
- 239 Kirchheiner J, Keulen J-THA, Bauer S, Roots I, Brockmüller J. Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol* 2008; **28**: 78–83.
- 240 Shams MEE, Arneith B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R *et al.* CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 2006; **31**: 493–502.
- 241 Kirchheiner J, Henckel H-B, Meineke I, Roots I, Brockmüller J. Impact of the CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype on mirtazapine pharmacokinetics and adverse events in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2004; **24**: 647–52.
- 242 Mrazek DA, Biernacka JM, O’Kane DJ, Black JL, Cunningham JM, Drews MS *et al.* CYP2C19 variation and citalopram response. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**: 1–9.
- 243 Tsai M-H, Lin K-M, Hsiao M-C, Shen WW, Lu M-L, Tang H-S *et al.* Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes influence metabolism of the antidepressant escitalopram and treatment response. *Pharmacogenomics* 2010; **11**: 537–46.
- 244 Huezo-Diaz P, Perroud N, Spencer EP, Smith R, Sim S, Viriding S *et al.* CYP2C19 genotype predicts steady state escitalopram concentration in GENDEP. *J Psychopharmacol* 2012; **26**: 398–407.
- 245 Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J* 2013; **13**: 1–11.
- 246 Persson A, Sim SC, Viriding S, Onishchenko N, Schulte G, Ingelman-Sundberg M. Decreased hippocampal volume and increased anxiety in a transgenic mouse model expressing the human CYP2C19 gene. *Mol Psychiatry* 2014; **19**: 733–41.

VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

1. AGRADECIMIENTOS	145
2. FINANCIACIÓN.....	147

1. AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante este camino y que han conseguido que esté aquí hoy escribiendo estos agradecimientos. Sin ellos no habría sido posible. Muchas gracias.

A mis tutores, Adrián LLerena y Eva Peñas, por su esfuerzo, cariño y dedicación incansable durante estos años. Por enseñarme que un doctor debe estar formado no solo en habilidades, sino también en valores. Por hacerme ver que este camino te enfrenta contigo mismo constantemente, y ayudarme a superar cada barrera.

Muy especialmente a mis compañeras de doctorado Carolina, Áurea y Alicia (¡¡¡ya Doctora!!), y a Bea e Inés, por sus palabras de ánimo y su apoyo en los momentos de dificultad. Por las risas que nos echamos juntas. Porque no sois solo compañeras, os habéis convertido en amigas.

A Fernando, por su sensatez y su humor constante, sin los cuáles esta parte del camino se hubiese hecho más dura. A Humberto, Paloma y Tere, por su cariño, compañerismo y amistad. A Pedro, que me acompañó y ayudó especialmente al inicio de esta fase. Al resto de miembros del CICAB y a todos los que alguna vez han formado parte de él.

A los voluntarios que han participado en los estudios, así como al equipo médico y técnico de los mismos, sin cuya colaboración no se hubiese podido realizar esta Tesis.

A mi familia y amigos, en especial a mis padres y hermanos. A mi padre, luchador incansable y ejemplo a seguir. A mi madre, por su apoyo incondicional. A mis hermanos, que me alegran el día.

Y, cómo no, a Pincho, por su confianza y por estar siempre ahí.

2. FINANCIACIÓN

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, la doctoranda ha sido financiada por el Gobierno de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e Innovación, y la Unión Europea/Fondo Social Europea (**PD10199**).

Los estudios de la presente Tesis Doctoral han sido parcialmente apoyados por el Instituto de Salud Carlos III-FIS y la Unión Europea (FEDER) (**PI10/02010** y **PI10/02758**); Fundación Portuguesa para la Ciencia y la Tecnología (FCT) (**PEst-C/SAU/LA0001/2011**); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) (**59366** y **2009-01-113063**); Gobierno de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e Innovación y la Unión Europea (FEDER) (**BS10023**).

La Tesis Doctoral en su conjunto es parte de la financiación concedida por la Cooperación Extremeña del Gobierno de Extremadura (AEXCID) (Proyecto **MESTIFAR 13IA001**) a SIFF; y está coordinada en la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (SIFF-RIBEF; www.ribef.com) y el Consorcio CEIBA para el estudio de Farmacogenética de poblaciones iberoamericanas.



La presente Tesis [XIX] 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	151
2. ÍNDICE DE FIGURAS	153
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	155
4. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL.....	157

1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Descripción de polimorfismos del *CYP2D6* más estudiados (adaptado de la base de la base de datos del Comité para la Nomenclatura de alelos de las enzimas CYP²⁹)

Tabla II. Fármacos test y metabolitos más utilizados para evaluar la capacidad hidroxiladora de la enzima *CYP2D6*.

Tabla III. Descripción de las frecuencias de genes activos multiplicados *CYP2D6*, gUMs y mUMs de *CYP2D6* en poblaciones Iberoamericanas de voluntarios sanos

Tabla IV. Correspondencia entre los Estudios y publicaciones incluidos en la presente Tesis Doctoral

Tabla V. Descripción general de los estudios de la presente Tesis.

Tabla VI. Secuencia de nucleótidos de los diferentes oligonucleótidos utilizados para la determinación de distintas variantes alélicas de *CYP2D6*.

Tabla VII. Descripción de las sondas TaqMan®, Código rs y SNPs *CYP2D6* clave utilizados para identificar diferentes alelos de *CYP2D6*.

Tabla VIII. Puntuación asignada a cada alelo *CYP2D6* para la extrapolación de los fenotipos metabólicos

Tabla IX. Descripción de los fármacos test, dosis y tiempo de recogida de la muestra de plasma propuestos en el cóctel CEIBA para la medida de la capacidad hidroxiladora de las enzimas *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* y *CYP3A4*

Tabla X. Exactitud y precisión del método de cuantificación de aripiprazol y dehidroaripiprazol.

Tabla XI. Descripción de las frecuencias de genes activos *CYP2D6* multiplicados y gUMs en los ocho grupos amerindias de México

Tabla XII. Descripción de las frecuencias de alelos *CYP2D6* estudiados en una población de 805 voluntarios sanos de España.

Tabla XIIIa. Descripción de las frecuencias de los genotipos *CYP2D6* obtenidos en una muestra de 805 voluntarios sanos de España.

Tabla XIIIb. Descripción de las frecuencias de los genotipos *CYP2D6* obtenidos en una muestra de 805 voluntarios sanos de España.

Tabla XIV. Descripción de las frecuencias de alelos *CYP2D6* estudiados en una población de 300 voluntarios sanos de Portugal.

Tabla XV. Descripción de las frecuencias alélicas *CYP2D6* en poblaciones de voluntarios sanos nativas americanas (amerindias), caucásicas, africanas, de judíos y de origen étnico no definido (mestiza) de Iberoamérica.

Tabla XVI. Descripción de las frecuencias de los diferentes fenotipos metabólicos estimados a partir de los datos de genotipo *CYP2D6* en poblaciones de voluntarios sanos nativas americanas (amerindias), caucásicas, africanas, de judíos Ashkenazi y de origen étnico no definido (mestiza) de Iberoamérica.

Tabla XVII. Frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo al fenotipo metabólico de debrisoquina ($MR > 12.6 = mPMs$; $MR \leq 12.6$ y $MR \geq 0.1 = mEMs$; $MR < 0.1 = mUMs$) y a las puntuaciones en “EDI-bulimia” de riesgo (≥ 5) frente a no riesgo.

Tabla XVIII. Frecuencia de mujeres sanas de Cuba clasificadas de acuerdo al número de alelos activos *CYP2D6* y a las puntuaciones en “EDI-bulimia” de riesgo (≥ 5) frente a no riesgo.

Tabla XIX. Alelos activos *CYP2D6* e historia de intentos suicidas en una población de pacientes con TCAs ($n = 204$) y una subpoblación de esta con diagnóstico de bulimia nerviosa purgativa ($n = 80$).

Tabla XX. Tasas de discontinuación del tratamiento antidepresivo monoterapéutico de fluoxetina o amitriptilina con respecto a diferentes fenotipos metabólicos y puntuaciones de actividad del genotipo *CYP2D6*.

Tabla XXI. Cócteles de fenotipación propuestos, incluyendo el cóctel CEIBA, para medir la capacidad hidroxiladora de diferentes enzimas CYP.

Tabla XXII. Frecuencia de genes *CYP2D6* multiplicados y de gUMs *CYP2D6* en las poblaciones europeas de voluntarios sanos con un número de individuos estudiados mayor o igual a 100.

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución bimodal del índice metabólico de debrisoquina/4hidroxi debrisoquina (\log_{10}) en una población de 925 voluntarios sanos españoles ⁴⁹. La flecha ascendente muestra la antimoda que separa los mPMs de los mEMs en esta población. Las líneas punteadas verticales separan los mPMs y los mUMs. Imagen tomada de ²¹.

Figura 2. Frecuencia de las principales variantes alélicas de *CYP2D6* en diferentes regiones geográficas. n = nº de individuos estudiados (Adaptada de la publicación A7.2).

Figura 3. Frecuencia de las principales variantes alélicas de *CYP2D6* en diferentes grupos étnicos.

Figura 4. Influencia del polimorfismo *CYP2D6* -1584C>G en los índices metabólicos de debrisoquina en los 320 voluntarios sanos estudiados. Los diferentes genotipos se han codificado de acuerdo al número de genes *CYP2D6* activos: 0 (portadores de dos alelos sin actividad *CYP2D6**3, *4, *5 o *6), 1 (portadores de un alelo activo y uno no activo), 2 (portadores de dos alelos activos *CYP2D6**1, *2, *10 o *17) y >2 (portadores de más de dos genes *CYP2D6* activos). La tendencia entre todos los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$; análisis Kruskal-Wallis del test de la varianza). Los diagramas de caja muestran la mediana (líneas negras), los rangos intercuartiles (cajas grises) y los valores atípicos (valores mayores al percentil 99 basándose en el diagrama de cajas de Tukey; puntos negros). n = nº de individuos. MR = índice metabólico. mUMs = metabolizadores ultrarrápidos. mEMs = metabolizadores rápidos. mPMs = metabolizadores lentos.

Figura 5. Cromatogramas obtenidos de una muestra de plasma blanco humano (A), una muestra de plasma blanco humano enriquecida con 14.6 μ /mL de prometazina, 200 ng/mL de aripiprazol y 200 ng/mL de dehidroaripiprazol (B) y una muestra de plasma extraída de un paciente que recibía 10 mg/día de aripiprazol (C). Picos: prometazina (1), aripiprazol (2) y dehidroaripiprazol (3).

Figura 6. Concentraciones plasmáticas en ng/mL de aripiprazol (A) y dehidroaripiprazol (B) en los 22 pacientes tratados con diferentes dosis de aripiprazol.

Figura 7. MR de aripiprazol/dehidroaripiprazol en un panel de pacientes tratados con aripiprazol. Los pacientes fueron estratificados según el número de genes activos *CYP2D6* y el tratamiento concomitante con inhibidores *CYP2D6*.

3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EMA: Agencia Europea del Medicamento

PGx: Farmacogenética

DNA: Ácido desoxirribonucleico

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

CYP: Citocromo P450

TDM: Monitorización terapéutica de fármacos

PM: Metabolizador lento

EM: Metabolizador rápido

IM: Metabolizador intermedio

UM: Metabolizador ultrarrápido

SNP: Polimorfismo de base única

DBQ: Debrisoquina

4-OHDBQ : 4-hidroxidebrisoquina

mPM: Metabolizador lento medido a partir de la administración de un fármaco test

mEM: Metabolizador rápido medido a partir de la administración de un fármaco test

mUM: Metabolizador ultrarrápido medido a partir de la administración de un fármaco test

gPM: Metabolizador lento estimado a partir de los datos del genotipo *CYP2D6*

gEM: Metabolizador rápido estimado a partir de los datos del genotipo *CYP2D6*

gUM: Metabolizador ultrarrápido estimado a partir de los datos del genotipo *CYP2D6*

MR: Índice metabólico

DXT: Dextrometorfano

SPT: Esparteína

mIM: Metabolizador intermedio medido a partir de la administración de un fármaco test

FEG: Fenotipo extrapolado del genotipo

gIM: Metabolizador intermedio estimado a partir de los datos del genotipo *CYP2D6*

Val: Valina

Met: Metionina

Arg: Arginina

Cys: Cisteína

Ser: Serina

Thr: Treonina

FDA: Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos

TCA: Trastornos del comportamiento alimentario

KSP: Escala de personalidad del Karolinska

ARI: Aripiprazol

DARI: Dehidroaripiprazol

XL-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa extra larga

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato

PCR-RT: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

CNV: Variación del número de copias

IS: Estándar interno

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

EDI: Inventario de los trastornos del comportamiento alimentario

AIM: Marcador informativo de ancestría

RIBEF: Red Iberoamericana de farmacogenética y Farmacogenómica

4. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

BLOQUE 1. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO METABÓLICO

Estudio I. Cóctel de fenotipación

1) **A1.** Evaluation of drug-metabolizing enzyme hydroxylation phenotypes in Hispanic populations: the CEIBA cocktail. de Andrés F, Sosa-Macías M, Lazalde-Ramos BP, Naranjo MEG, Tarazona-Santos E, Llerena A; CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEFa. *Drug Metabol Drug Interact.* 2013;**28**:135-46.

Estudio II. *CYP2D6* -1584C>G

2) **A2.** *CYP2D6* -1584C>G promoter polymorphism and debrisoquine ultrarapid hydroxylation in healthy volunteers. Llerena A, Dorado P, Ramírez R, Calzadilla LR, Peñas-Lledó E, Álvarez M, Naranjo MEG, González I, Pérez B; CEIBA Consortium of Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF. *Pharmacogenomics.* 2013;**14**:1973-7.

Estudio III. MR ARI/DARI

3) **A3.1.** High-performance liquid chromatography method using ultraviolet detection for the quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in psychiatric patients. Dorado P, de Andrés F, Naranjo MEG, Peñas-Lledó EM, González I, González AP, de la Rubia A, Llerena A. *Drug Metabol Drug Interact.* 2012;**27**:165-70.

4) **A3.2.** Influence of *CYP2D6* polymorphism on aripiprazol plasma levels in psychiatric patients. Llerena A, Naranjo MEG, de la Rubia A, González I, Dorado P, Peñas-Lledó EM. (*Manuscrito*).

BLOQUE 2. VARIABILIDAD INTERÉTNICA

Estudio IV. México

5) **A4.** *CYP2D6* gene polymorphisms and predicted phenotypes in eight indigenous groups from northwestern Mexico. Lazalde-Ramos BP, Martínez-Fierro Mde L, Galaviz-Hernández C, Garza-Veloz I, Naranjo MEG, Sosa-Macías M, Llerena A. *Pharmacogenomics.* 2014;**15**:339-48.

Estudio V. España

6) **A5.** Pharmacogenetics of *CYP2D6* in a Spanish population: Controversy about the high frequency of ultrarapid metabolizers. Naranjo MEG, Delgado A, Cobaleda J, Peñas-Lledó EM, Llerena A. (*Manuscrito*).

Estudio VI. Portugal

7) **A6.** Characterization of *CYP2D6* genotypes and metabolic profiles in the Portuguese population: pharmacogenetic implications. Albuquerque J, Ribeiro C, Naranjo MEG, Llerena A,

Grazina M, CEIBA.FP Consortium of the Ibero–American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF. *Personalized Medicine*. 2013;**10**:709-18.

Estudio VII. Iberoamérica

8) A7.1. CYP2D6 ethnic variability in Hispanics. Llerena A, Dorado P, Naranjo MEG, Peñas-Lledó EM. In: *CYP2D6: Genetics, Pharmacology and Clinical Relevance*. Future Medicine Ltd. 2014 eISBN (PDF): 978-1-78084-462-6.

9) A7.2. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. Llerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Penas-Lledó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;**10**:1569-83.

10) A7.3. Latin Americans populations Pharmacogenetics: The CEIBA-Consortium initiative. Llerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Céspedes-Garro C, Barrantes R, Calzadilla LR, Estévez-Carrizo FE, Grazina M, López-López M, Moya GE, Ortiz-López R, Ramírez-Roa R, Rodeiro I, Sarmiento AP, Sosa-Macías MG, Tarazona-Santos E, Terán E, & CEIBA-Consortium of the Iberoamerican Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. (*Manuscrito*).

11) A7.4. Interethnic CYP2D6, CYP2C9 and CYP2C19 variability across Latinamerican populations: Relevancy of the ancestry. Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Barrantes R, Calzadilla LR, Estévez-Carrizo FE, Grazina M, López-López M, Moya GE, Ortiz-López R, Ramírez-Roa R, Rodeiro I, Sarmiento AP, Sosa-Macías MG, Tarazona-Santos E, Terán E, Llerena A & CEIBA-Consortium of the Iberoamerican Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. (*Manuscrito*).

BLOQUE 3. IMPLICACIONES CLÍNICAS EN SALUD MENTAL

Estudio VIII. Riesgo TCA

12) A8. Eating Disorder Symptoms and CYP2D6 Variation in Cuban Healthy Females: A Report from the Ibero-American Network of Pharmacogenetics. Peñas-Lledó EM, González I, Dorado P, Pérez B, Calzadilla LR, Álvarez M, Naranjo MEG, Llerena A and CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenomics RIBEF. *Current Pharmacogenomics and Personalize Medicine*. 2012;**10**(4):288-92.

Estudio IX. Suicidio TCA

13) A9.1. Impact of cytochrome P450 genes on suicide attempt and risk. Peñas-Lledó EM, Naranjo MEG, Llerena A. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2013;**263**:703-4.

14) A9.2. CYP2D6 UMs and attempted suicide in purging bulimia nervosa. Peñas-Lledó EM, Camarena B, Naranjo MEG, Delgado A, Hernández S, Caballero A, Luna D, González L, Flores G, Llerena A.

Estudio X. Discontinuación antidepresivos

15) A10. CYP2D6 ultrarapid metabolism and early dropout from fluoxetine or amitriptyline monotherapy treatment in major depressive patients. Peñas-Lledó EM, Trejo HD, Dorado P, Ortega A, Jung H, Alonso E, Naranjo MEG, López-López M, Llerena A. *Mol Psychiatry*. 2013 Jan;18(1):8-9