

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE MEDICINA

POLIMORFISMO NAT2 Y PATOLOGÍA HUMANA

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
MEDICINA POR D. JESÚS MIGUEL GARCÍA MENAYA

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Pizarro, 8

Cáceres 10071

Correo e.: publicac@unex.es

<http://www.pcid.es/public.htm>

D. JOSÉ AUGUSTO GARCÍA-AGÚNDEZ PÉREZ-COCA, PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGÍA Y D. JULIO BENÍTEZ RODRÍGUEZ CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Certifican que:

D. Jesús Miguel García Menaya ha realizado bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado "Polimorfismo NAT2 y patología humana".

Como directores del trabajo, hacemos constar que ha sido realizado con todas las garantías técnicas y metodológicas y que las conclusiones obtenidas son plenamente válidas, siendo considerado por tanto apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Badajoz a dieciséis de Julio de dos mil uno.

Fdo.:José Augusto García-Agúndez Pérez-Coca Fdo.:Julio Benítez Rodríguez

A mi familia que en todo momento ha constituido para mi un estímulo y una motivación para llevar a cabo este trabajo y ha sido de gran ayuda en muchos momentos.

Agradezco la colaboración prestada para la realización de esta Tesis a todos los miembros del Departamento de Farmacología, especialmente a los directores J.A.G. Agúndez y J. Benítez que siempre me han facilitado el desarrollar esta tarea.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Polimorfismo acetilador

- 1.1. Antecedentes históricos y características generales del Polimorfismo acetilador7
- 1.2. Bases genéticas del polimorfismo NAT2 11
- 1.3. Variaciones interétnicas del polimorfismo acetilador 15
- 1.4. Asociación del polimorfismo NAT2 con diferentes patologías 17
- 1.5. NAT2 y diabetes mellitas23

2. Polimorfismo del gen CYP2D626

- 2.1. Características generales del polimorfismo CYP2D626
- 2.2. Bases genéticas del polimorfismo CYP2D628
- 2.3. Variaciones interétnicas del polimorfismo CYP2D6.....34
- 2.4. Asociación del polimorfismo CYP2D6 con diferentes patologías ..34
- 2.5. CYP2D6 y diabetes mellitas37

3. Objetivos38

PACIENTES Y MÉTODOS40

- 1. Sujetos de estudio40
- 2. Métodos40
 - 2.1. Material de laboratorio40
 - 2.2. Reactivos41
 - 2.3. Técnicas analíticas.....44
 - 2.3.1 Purificación de DNA genómico44

2.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa de DNA (PCR) (Acetilación	48
2.3.2.1.	Amplificación inespecífica.....	49
2.3.2.2	Amplificación específica.....	50
2.3.2.	PCR alelo- específico (oxidación	53
2.3.3.	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP	56
2.4	Análisis estadístico	60
RESULTADOS.....		61
DISCUSIÓN		71
CONCLUSIONES		79
REFERENCIAS.....		80

LISTA DE ABREVIATURAS

- A: Adenina.
- Acetil-CoA: Acetil coenzima A.
- Arg: Arginina.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- C: Citosina.
- CYP1A2: Citocromo P-450 1A2.
- CYP2D6: Citocromo P-450 2D6.
- DMID: Diabetes mellitus insulín-dependiente.
- DMNID: Diabetes mellitus no insulín-dependiente.
- DNA: Ácido desoxiribonucleico.
- DS:Desviación estándar.
- G: Guanina.
- Glu: Ácido glutámico.
- Glu: glutamina.
- Gly: Glicina.
- His: Histidina.
- IC: Intervalo de confianza.
- Ile: Isoleucina.
- Kb: Kilobases.
- kDa: Kilodaltons.
- Lys: Lisina.
- ML: Metabolizador lento.
- MR: Metabolizadores rápidos.
- NADPH-reductasa: Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina reducido.
- NAT1: Arilamina N-acetiltransfera 1.

- NAT2: Arilamina N-acetiltransferasa 2.
- NNK: 4-(N-metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona.
- OR: Odds ratio.
- PABA: Ácido *p*-aminobenzoico.
- PAS: Ácido *p*-salicílico.
- pb: Pares de bases.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- Pro: Prolina.
- RFLP: Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.
- Ser: Serina.
- T: Timina.
- Thr: Treonina.
- UR: Metabolizadores ultrarrápidos.
- Wt: Wild-type.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acetilación de isoniazida	8
Figura 2. Disposición de los genes <i>NAT1</i> , <i>NAT2</i> y <i>NATP</i>	11
Figura 3. Estructura del locus <i>NAT2</i>	11
Figura 4. Posibles mecanismos de activación y desactivación metabólica de carcinógenos de tipo arilaminas.....	18
Figura 5. Esquema del locus <i>CYP2D</i>	28
Figura 6. Esquema de las alteraciones del locus <i>CYP2D</i>	30
Figura 7. Reacciones de amplificación por PCR para la detección de mutaciones puntuales en el gen <i>NAT2</i>	48
Figura 8. Frecuencia de las variantes alélicas de <i>NAT2</i> en pacientes y controles.....	66
Figura 9. Fenotipo acetilador predicho a partir del análisis genético en pacientes y controles.....	66
Figura 10. Frecuencia de acetiladores rápidos en pacientes con y sin antecedentes familiares de diabetes	67
Figura 11. Frecuencia de variantes alélicas de <i>CYP2D6</i> en pacientes y controles.....	69
Figura 12. Fenotipo de hidroxilación predicho a partir del análisis genético en pacientes y controles	69
Figura 13. Correlación entre la prevalencia de DMNID y la frecuencia de acetiladores rápidos en distintos países.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sustratos metabolizados por la enzima NAT2	10
Tabla 2. Variantes alélicas del gen <i>NAT2</i> en humanos	12
Tabla 3. Porcentaje de acetiladores lentos en distintas poblaciones	16
Tabla 4. Relación entre el status acetilador y distintas patologías.....	21
Tabla 5. Relación entre diabetes mellitus tipo I y fenotipo acetilador.....	24
Tabla 6. Relación entre diabetes mellitus tipo II y fenotipo acetilador....	24
Tabla 7. Distribución de frecuencias de distintas variantes alélicas de <i>CYP2D6</i> en diversas poblaciones	34
Tabla 8. Relación entre el status oxidativo y distintas patologías	36
Tabla 9. Frecuencia de las mutaciones de <i>NAT2</i> analizadas	61
Tabla 10. Frecuencia de mutaciones de <i>NAT2</i> presentes en genes rápidos y lentos en los pacientes con DMNID	63
Tabla 11. Genotipo <i>NAT2</i> de todos los pacientes y controles	64
Tabla 12. Genotipo <i>CYP2D6</i> de los pacientes y controles	68
Tabla 13. Relación entre diabetes mellitus tipo I y fenotipo acetilador (Odds ratio e intervalo de confianza.....	72
Tabla 14. Relación entre diabetes melitus tipo II y fenotipo acetilador (Odds ratio e intervalo de confianza.....	72

INTRODUCCIÓN

1. POLIMORFISMO ACETILADOR

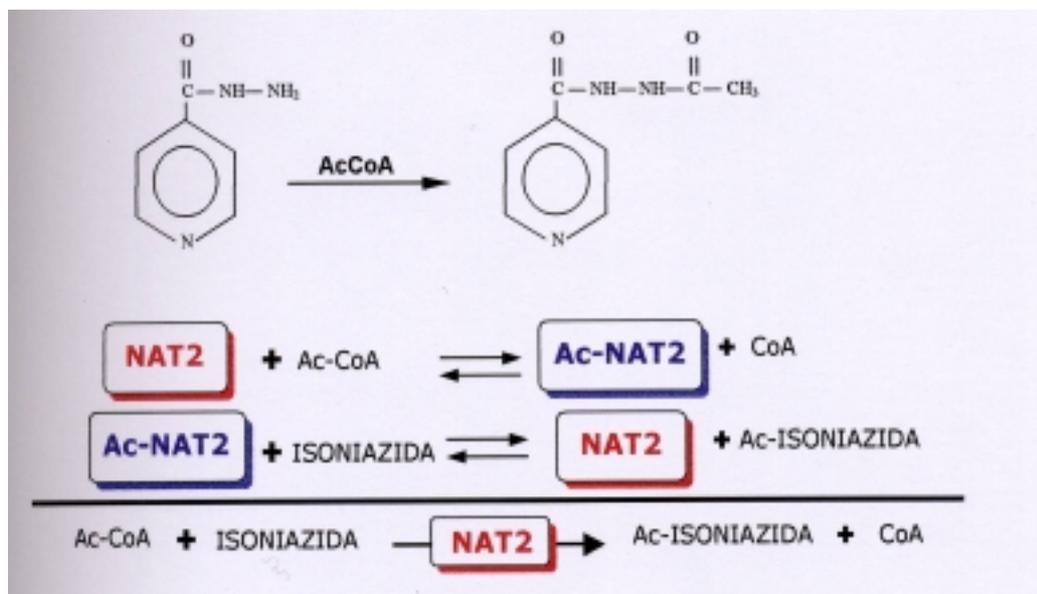
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL POLIMORFISMO ACETILADOR

El polimorfismo acetilador fue descubierto hace más de 40 años tras la introducción de la isoniazida para el tratamiento de la tuberculosis. La neuropatía producida por dicho fármaco estaba en relación con altos niveles plasmáticos del mismo (Bönicke y Reif 1953). Dado que la isoniazida tenía una estructura química similar a otros compuestos también acetilados como el ácido *p*-aminosalicílico y algunas sulfonamidas, se sospechó que la acetilación podría ser su vía de metabolización. En 1955 Hugues y cols. describen que el principal metabolito excretado de la isoniazida es la acetilisoniazida y que el patrón de metabolismo de isoniazida en un mismo individuo permanece constante a lo largo del tiempo. Mitchel y Bell en 1957 clasifican a un grupo de pacientes en tratamiento con isoniazida como inactivadores lentos (60% de la población), rápidos (25%) e intermedios (15%) en función de los resultados obtenidos al medir las concentraciones séricas de fármaco microbiológicamente activo a las 6 horas de la ingesta de 4 mg/kg de peso. Estudios familiares indicaron que la capacidad metabolizadora dependía de la constitución genética (Evans 1960). Se observó que aproximadamente la mitad de los pacientes de raza blanca eliminaban lentamente la isoniazida de sus organismos debido a una reducción en la tasa de N-acetilación en el hígado. Posteriores estudios *in vivo* e *in vitro* concluyeron que la metabolización de una amplia variedad de arilaminas, hidrazinas y xenobióticos se encuentra afectada por el mismo defecto genético (Weber 1987; Evans 1989).

La reacción enzimática de N-acetilación hepática es llevada a cabo por la enzima citosólica Arilamina N-acetiltransferasa (NAT; E.C. 2.3.1.5) e implica la transferencia de acetato procedente del Acetil Coenzima A (Acetil-

CoA) a aminas aromáticas e hidrazinas para dar lugar a acetamidas e hidrazidas respectivamente.

Figura 1. Acetilación de isoniazida.



Existen dos tipos de sustratos susceptibles de ser metabolizados por acetilación. En primer lugar aquellos que, al igual que la isoniazida son metabolizados con distinta rapidez según la capacidad genética y con los cuales se observa una clara distribución bimodal en la población (tales como sulfametazina y procainamida entre otros) y por otra parte aquellos en los que la distribución es aparentemente unimodal. Estos últimos se conocen como sustratos de metabolismo monomórfico y entre ellos se encuentran el ácido *p*-salicílico (PAS) y el ácido *p*-aminobenzoico (PABA). Ello hizo sospechar de la existencia de diferentes tipos de N-acetiltransferasas de tal manera que aquella que metaboliza los sustratos de modo polimórfico fue denominada NAT2 y aquella que metaboliza los sustratos de modo monomórfico fue denominada NAT1. Jenne en 1965 fue el primero que realizó un estudio bioquímico detallado en tejido hepático de acetiladores rápidos y lentos,

sugiriendo que 2 enzimas diferentes eran las responsables del metabolismo monomórfico y polimórfico de los sustratos, siendo una de ellas cuantitativamente menor en el hígado de los individuos metabolizadores lentos. Estudios similares realizados con posterioridad en pacientes a los cuales se les había fenotipado mediante la realización del test de la cafeína confirmaron los hallazgos iniciales de Jenne (Grant y cols., 1990).

Según el fenotipo NAT2 la población queda distribuida bimodalmente. Se habla de polimorfismo genético cuando existen como mínimo 2 fenotipos en la población no teniendo ninguno de ellos una frecuencia inferior al 1% (Meyer 1991).

Los metabolizadores lentos tendrán mayor riesgo de sufrir efectos adversos producidos por fármacos cuya vía metabólica principal sea por acetilación. Por el contrario los metabolizadores más rápidos es posible que no alcancen los niveles terapéuticos adecuados. Entre algunos de los fármacos que son acetilados polimórficamente (Tabla 1) se encuentran los siguientes: dapsona, hidralazina, procainamida, aminoglutetimida, sulfadiazina, sulfametacina y metabolitos de clonazepan, dipirona, aminopirina y cafeína. Pero no sólo se metabolizan fármacos mediante acetilación, sino que ciertos xenobióticos que son cancerígenos también son metabolizados a través de dicha ruta. Entre ellos tenemos la benzidina, el 2-aminofluoreno y la B-naftilamina.

Durante mucho tiempo se pensó que otra N-acetiltransferasa hepática llamada NAT1 era una enzima monomórfica que metabolizaba a fármacos como el PAS y el PABA. Sin embargo, existen recientes investigaciones que han descartado el presunto carácter monomórfico de la NAT1. Dichos estudios han demostrado que existen numerosas variantes alélicas para esta enzima (Vatsis y Weber 1993; Vatsis y cols. 1995; Payton y Sim 1998; Lin y Cols., 1998; Zhao y cols., 1998; Dhaini y Levy 2000) algunas de las cuales conducen a un fenotipo NAT1 lento.

Tabla 1. Sustratos metabolizados por la enzima NAT2.

SUSTRATO	REFERENCIA
Fármacos	
Aminoglutetimida	Coombes y cols., 1982
Aminopirina	Agúndez y cols., 1995a
Amrinona	Hamilton y cols., 1986
Cafeína (metabolitos)	Grant y cols., 1984
Clonazepam (metabolitos)	Olivera y cols., 1998
Dapsona	Peters y Levy 1971
Dipirona	Levy y cols., 1984
Fenelzina	Hein y Weber 1982
Hidralazina	Evans y White 1964
Nitrazepam (metabolitos)	Karim y Evans 1976
Procainamida	Karlsson y cols., 1975
Sulfametacina	Evans 1962
Sulfapiridina	Schröder y Evans 1972
Xenobióticos	
Benzidina	Cartwright y cols., 1982
4-aminobifenil	Vineis y cols., 1994
4-aminofenol	Hein y cols., 1993
2-aminofluoreno	Hein y cols., 1993
2-naftilamina	Lower y cols., 1979

1.2 BASES GENÉTICAS DEL POLIMORFISMO NAT2

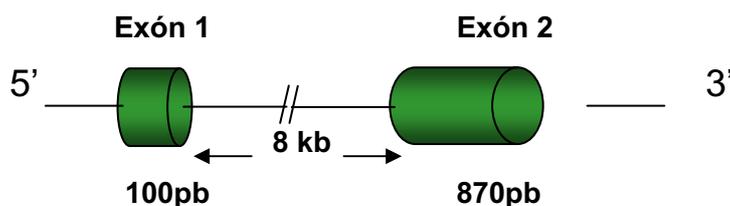
Los genes que codifican las enzimas NAT1 y NAT2 están localizados en el cromosoma 8 (pterq11), pero están separados al menos por unas 25 kb (kilobases) (Figura 2). Ambos tienen una similitud del 87% en la secuencia de nucleótidos y codifican sendas proteínas de 290 aminoácidos que coinciden en un 81%.

Figura 2. Disposición de los genes *NAT1*, *NAT2* y *NATP*.



Se demostró la existencia de 3 genes distintos de N-acetiltransferasas en humanos: *NAT1*, *NAT2* y *NATP*. *NAT2* está codificado por un exón de 870 pb (pares de bases) y existe otro exón de 100 pb situado a 8 kb en dirección 5' de función desconocida (Figura 3). *NATP* es un pseudogen que contiene mutaciones que impiden a su ácido ribonucleico mensajero (RNAm) traducirse en proteína funcional. El peso molecular de *NAT1* y *NAT2* es de 33 y 31 kilodaltons (kDa) respectivamente.

Figura 3. Estructura del locus *NAT2*.



Actualmente se han descrito 21 variantes alélicas del gen *NAT2* (Tabla 2).

El alelo normal *NAT2*4* corresponde al fenotipo acetilador rápido (Vatsis y cols., 1995), mientras que cada una de las variantes alélicas descritas presenta una combinación de 1 a 4 sustituciones de nucleótidos en las siguientes posiciones:

- Posición 191: El alelo mutado presenta adenina (A) en lugar de guanina (G), cambiándose el aminoácido Glutamina (Glu) por Arginina (Arg) (Bell y cols., 1993). Esta mutación ocurre predominantemente en individuos de raza negra, aunque se ha descrito en poblaciones de raza blanca (Agúndez y cols., 1996a) y en poblaciones iberoamericanas (Martínez y cols., 1998).

-Posición 282: El alelo mutado contiene timina (T) en lugar de citosina (C). Esta es una mutación silente que no produce ningún cambio de aminoácido (Blum y cols., 1991). Sin embargo, pese a ser una mutación silente, se ha demostrado que da lugar a un fenotipo metabolizador lento (Meyer y Zanger, 1997).

-Posición 341: El alelo mutado presenta C en lugar de T, provocándose un cambio del aminoácido Isoleucina (Ile) por Treonina (Thr) (Hein y cols., 1994).

Tabla 2. Variantes alélicas del gen *NAT2* en humanos.

ALELO	CAMBIOS NUCLEOTIDOS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (In vivo)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (In vitro)
<i>NAT2*4</i>		Normal	Normal
<i>NAT2*5A</i>	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T	Desconocida	Disminuida
<i>NAT2*5B</i>	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T; A ⁸⁰³ G	Disminuida	Disminuida
<i>NAT2*5C</i>	T ³⁴¹ C; A ⁸⁰³ G	Desconocida	Desconocida
<i>NAT2*5D</i>	T ³⁴¹ C	Desconocida	Disminuida
<i>NAT2*5E</i>	T ³⁴¹ C; G ⁵⁹⁰ A	Desconocida	Disminuida

NAT2*6A	C ²⁸² T;G ⁵⁹⁰ A	Disminuida	Disminuida
NAT2*6B	G ⁵⁹⁰ A	Desconocida	Desconocida
NAT2*7A	G ⁸⁵⁷ A	Disminuida	Disminuida
NAT2*7B	C ²⁸² T;G ⁸⁵⁷ A	Disminuida	Disminuida
NAT2*12A	A ⁸⁰³ G	Desconocida	Desconocida
NAT2*12B	C ²⁸² T;A ⁸⁰³ G	Desconocida	Desconocida
NAT2*12C	C ⁴⁸¹ T;A ⁸⁰³ G	Desconocida	Desconocida
NAT2*13	C ²⁸² T	Desconocida	Desconocida
NAT2*14A	G ¹⁹¹ A	Disminuida	Desconocida
NAT2*14B	G ¹⁹¹ A;C ²⁸² T	Disminuida	Desconocida
NAT2*14C	G ¹⁹¹ A;T ³⁴¹ C;C ⁴⁸¹ T;A ⁸⁰³ G	Desconocida	Disminuida
NAT2*14D	G ¹⁹¹ A;C ²⁸² T;G ⁵⁹⁰ A	Desconocida	Disminuida
NAT*14E	G ¹⁹¹ A;A ⁸⁰³ G	Desconocida	Disminuida
NAT2*17	A ⁴³⁴ C	Desconocida	Desconocida
NAT2*18	A ⁸⁴⁵ C	Desconocida	Desconocida

- Posición 434: Se sustituye A por C (Lin y cols., 1994). Esta mutación es muy poco frecuente (Meyer y Zanger, 1997).

- Posición 481: El alelo mutado contiene T en vez de C, lo cual no produce ningún cambio de aminoácido (Abe y cols., 1993).

- Posición 590: El alelo mutado presenta A en lugar de G, sustituyéndose el aminoácido Gln por Arg (Blum y cols., 1991).

- Posición 803: El alelo mutado presenta G en lugar de A, cambiándose el aminoácido Lisina (Lys) por Arg (Abe y cols., 1993).

- Posición 845: Se sustituye el aminoácido A por C (Lin y cols., 1994). Se trata de otra mutación muy infrecuente y su efecto *in vivo* es desconocido.

- Posición 857: El alelo mutado contiene A en lugar de G, cambiándose el aminoácido Glicina (Gly) por Acido Glutámico (Glu) (Deguchi 1992).

Aquellos genes que presentan mutaciones en las posiciones 481 ó 803 y los que no presentan mutaciones se consideran genes activos. Por el contrario, los que presentan mutaciones en las posiciones 191, 282, 341, 590 y 857 codifican enzimas con una velocidad máxima de N-acetilación y O-

acetilacion significativamente menor que los genes activos y se consideran inactivos (Meyer y Zanger, 1997).

1.3 VARIACIONES INTERÉTNICAS DEL POLIMORFISMO ACETILADOR

El porcentaje de individuos acetiladores lentos varía en función de la zona geográfica y la raza. En la raza blanca la población de metabolizadores lentos oscila entre un 40% y un 70%. En España dicho porcentaje es de un 57% (Ladero y cols., 1979). Sin embargo, en poblaciones orientales la frecuencia de metabolizadores lentos es mucho más baja con valores próximos al 10% (Evans 1992) y aún más baja todavía en esquimales canadienses donde los acetiladores lentos representan un 5% de la población. En otras poblaciones como en egipcios y marroquíes el porcentaje de acetiladores lentos es mayor que en caucásicos. Otras poblaciones como los Hispanos Centroamericanos tienen valores intermedios entre los caucásicos y los orientales (Martínez y cols., 1998). El motivo de estas diferencias interétnicas es que las diferentes poblaciones presentan distintos porcentajes de variaciones alélicas. Así pues, los japoneses tienen un mayor porcentaje del alelo wild-type (Wt) y del alelo *NAT2*7B*, mientras que tienen una menor frecuencia del alelo *NAT2*5A* (Deguchi y cols., 1990) que es el predominante en la población caucásica. Otro interesante ejemplo de diferencias interétnicas lo representa el estudio publicado por Bell y cols. en 1993, donde los autores estudian 2 poblaciones una de americanos de raza blanca y otra de americanos de origen africano, encontrando en esta segunda población una nueva mutación (*NAT2*14A*), que no se observó en ninguno de los 372 caucásicos estudiados.

Ha sido descrita una mayor proporción de acetiladores lentos en los orientales (alelo q) en el litoral asiático del Pacífico, según nos acercamos desde el norte hasta el ecuador (Sunahara y cols., 1961), alcanzándose cifras muy altas de este alelo q en Tailandia. Sin embargo, esta aproximación no es válida para todas las poblaciones, puesto que la población de Papua-Nueva Guinea- no sigue este patrón y a pesar de estar muy cerca del Ecuador la frecuencia en ellos del alelo q es muy baja (Evans 1992).

Tabla 3. Porcentaje de acetiladores lentos en distintas poblaciones.

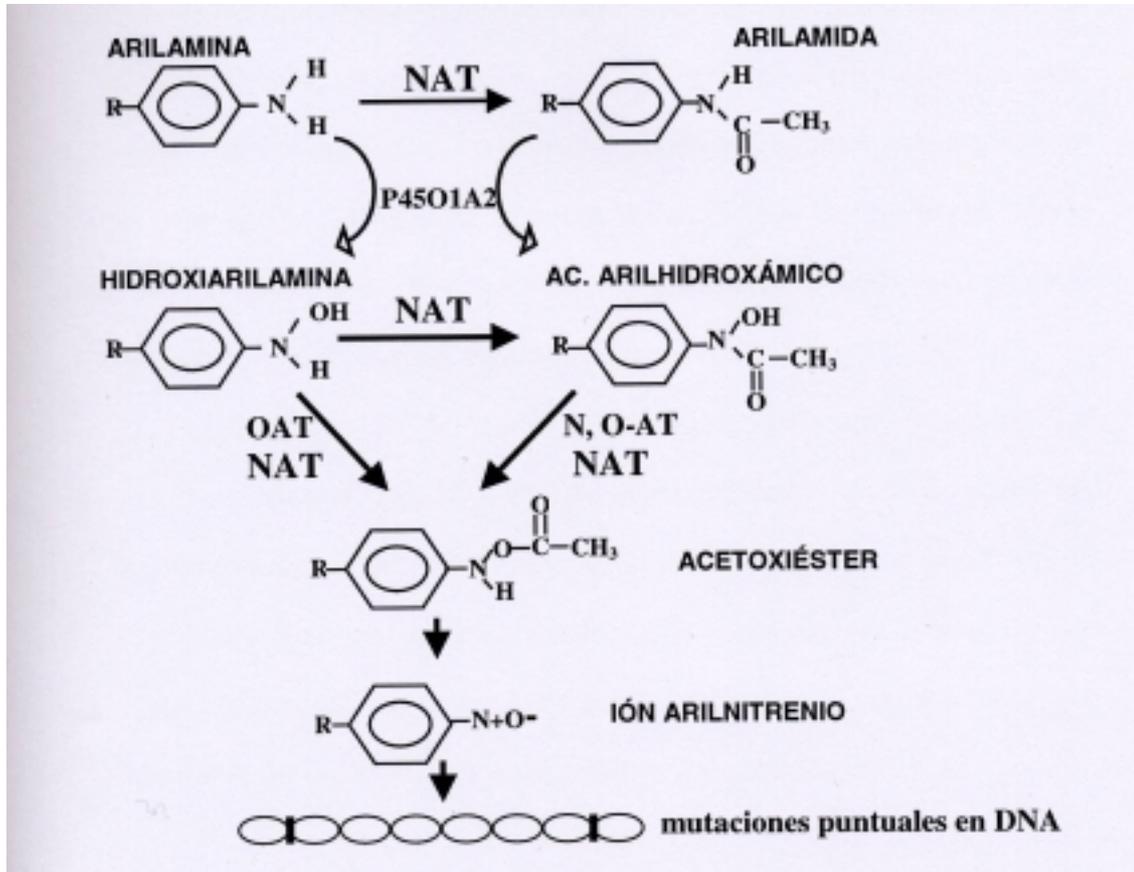
Grupo étnico	Porcentaje de acetiladores lentos
Blancos-Canadienses	76.0
Blancos-Americanos	76.0
Africanos (Dogons)	75.0
Indios	74.3
Blancos -Europeos	73.7
Africanos (Gabón)	73.0
Africanos-Americanos	65.3
Filipinos	60.5
Hispano-Americanos	59.7
Chinos	46.8
Polinesios	40.0
Amerindios (Colombia)	34.7
Japoneses	32.9
Coreanos	31.9
Amerindios (Panamá)	26.0

1.4 ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO NAT2 CON DIFERENTES PATOLOGÍAS

El polimorfismo del gen *NAT2* se ha relacionado con la posibilidad de tener mayor riesgo de desarrollar determinadas enfermedades, además de sufrir con más facilidad los efectos adversos de fármacos metabolizados por acetilación. Dentro de las enfermedades, aquellas que han recibido más atención han sido las neoplásicas. Ello se debe a que determinadas sustancias cancerígenas del tipo de aminas aromáticas son metabolizadas por la enzima *NAT2* (Tabla 1), por lo cual se podría especular que aquellos individuos metabolizadores lentos tendrían más posibilidades de desarrollar determinadas neoplasias. Pero la acetilación no sólo es la vía de detoxificación de ciertos compuestos potencialmente cancerígenos, sino que en ocasiones, determinadas sustancias procancerígenas pueden ser activadas mediante O-acetilación produciéndose acetoxiarilaminas. Éstas se rompen espontáneamente originando iones aril-nitrenios, altamente reactivos y responsables de mutaciones en el ácido desoxiribonucleico (DNA) (Figura 4). Además, no sólo intervienen estas enzimas, sino que intervienen otras vías metabólicas como la del citocromo P450 1A2 (*CYP1A2*). Dependiendo de la selectividad de las diferentes enzimas, los distintos productos químicos seguirán unas vías metabólicas u otras.

El cáncer que parece estar más relacionado con el polimorfismo acetilador *NAT2* es el de vejiga. Diferentes estudios relacionan claramente el fenotipo y el genotipo acetilador lento con el cáncer de vejiga. El primer estudio fue llevado a cabo por Lower y cols. en 1979 en Dinamarca y Suecia. Posteriormente, otros muchos estudios (Evans y cols., 1983; Inatomi y cols., 1999; Marcus y cols., 2000) han confirmado estos resultados siendo esta asociación todavía más evidente cuando los pacientes se encuentran ocupacionalmente expuestos a aminas cancerígenas (benzidina, B-naftilamina).

Figura 4. Posibles mecanismos de activación y desactivación metabólica de carcinógenos de tipo arilaminas.



En un estudio realizado en 1982 Cartwright y cols. fenotiparon a 23 pacientes ocupacionalmente expuestos que habían desarrollado cáncer de vejiga y sólo uno de ellos resultó ser metabolizador rápido. Marcus y un grupo de expertos internacionales realizaron en 2000 un metaanálisis estudiando la posible relación entre el status acetilador y el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga. Analizaron datos procedentes de 16 estudios realizados en diferentes países. En total se contabilizaron 1999 casos. El resultado de los análisis estadísticos fue que la asociación entre fumar y desarrollar cáncer de vejiga es mayor entre los acetiladores lentos que entre los rápidos. Además, esta asociación es aún más consistente si se tienen en cuenta los 10 estudios que habían sido realizados en población europea.

Son numerosos los estudios que relacionan a los metabolizadores rápidos con una mayor propensión a padecer cáncer colorrectal (Lang y cols., 1986; Hett y cols., 1987; Roberts-Thomson y cols., 1996). Se supone que ciertos procancerígenos contenidos en determinados alimentos como ahumados y carnes demasiado cocinadas pasarían a ser activados mediante la vía de O-acetilación, siendo esta vía tan predominante como la de la N-acetilación en la mucosa intestinal, al contrario de lo que ocurre en la mucosa vesical. Sin embargo, existen discrepancias puesto que otros autores (Ladero y cols., 1991a; Kirling y cols., 1991) no han observado diferencias en el fenotipo acetilador en los pacientes afectos de cáncer de colon. A esas mismas conclusiones se llega en una reciente revisión del tema (Brockton y cols., 2000). Además, en japoneses, que presentan una alta frecuencia de acetiladores rápidos, la incidencia de cáncer colorrectal es baja. Estas discrepancias aparentes pueden ser debidas a la simplificación que supone considerar a todos los pacientes con cáncer colorrectal como un solo grupo, cuando cada vez pesa más la teoría de que los tumores proximales y los distales pueden tener diferentes factores de riesgo. En el año 2000 Agúndez y cols. estudian el genotipo acetilador de 120 pacientes afectos de cáncer de colon, observando que el genotipo acetilador rápido sólo constituye un factor de riesgo para aquellos tumores localizados a nivel del colon sigmoide, pero no para aquellos cánceres de colon que presentaban una localización diferente.

Con respecto a otros tipos de cáncer existen trabajos contradictorios en unos casos, siendo en otros el número de estudios realizados demasiado pequeño como para poder llegar a conclusiones sólidas. El cáncer de laringe se relacionó con acetiladores lentos (Drozd y cols., 1987). Contrariamente, el cáncer de pulmón fue puesto en relación con homocigotos acetiladores rápidos, pero no ha existido confirmación posterior (Martínez y cols., 1995). Exactamente igual ha ocurrido con el cáncer de mama, observándose asociaciones iniciales con acetiladores rápidos (Bulovskaya y cols., 1978),

pero no siendo confirmados estos resultados con estudios posteriores tanto a nivel de fenotipo como de genotipo (Ladero y cols., 1987; Agúndez y cols., 1995b). Respecto al cáncer de hígado, existe un estudio que lo relaciona con presentar un genotipo acetilador lento (Agúndez y cols., 1996b).

En lo referente a otras enfermedades diferentes del cáncer, también se han realizado numerosos estudios, pero en la mayoría de los casos los resultados obtenidos inicialmente no han podido después ser confirmados. Hay que reseñar que en estos estudios iniciales a nivel de fenotipo las muestras de población utilizadas eran demasiado pequeñas, impidiendo este hecho el obtener conclusiones definitivas. Además, también hay que tener en cuenta que tanto las distintas enfermedades estudiadas como los diferentes tratamientos aplicados podrían interferir con el fenotipo, es decir, que un determinado fenotipo entre los pacientes puede ser causa o efecto de la enfermedad. En este sentido hay que recordar que el genotipo no es el único factor determinante de la actividad N-acetiltransferasa, como se verá más detalladamente en el capítulo de Discusión en esta Tesis. Algunas de las enfermedades más estudiadas han sido la artritis reumatoide, la enfermedad de Parkinson y el lupus eritematoso sistémico no encontrándose asociaciones u obteniéndose resultados no confirmados con posterioridad. Sin embargo, el lupus eritematoso inducido por fármacos (fundamentalmente producido por procainamida e hidralazina) si que se ha relacionado claramente con metabolizadores lentos, siendo exclusivo de ellos (Woosley y cols., 1978; Strandberg y cols., 1976). La posible patogenia de este trastorno es que aquellos individuos metabolizadores lentos tienen un mayor porcentaje de fármaco no acetilado, que sigue rutas metabólicas alternativas, interaccionando con macromoléculas celulares, dando lugar a sustancias que son reconocidas como autoantígenos, provocándose de esta manera la respuesta inmunitaria.

Tabla 4. Relación entre el status acetilador y distintas patologías.

Patología	Status	Análisis fenotipo	Análisis genotipo	Referencia
<u>Cáncer</u>				
Pulmón	Rápido		-	Martinez y cols., 1995
Laringe	Lento	+		Drozd y cols., 1987
	Rápido		+	Henning y cols., 1999
Hígado	Lento		+	Agúndez y cols., 1996b
Mama	Rápido	+		Bulovskaya y cols., 1978
	Rápido	-		Ladero y cols., 1987a
	Rápido		-	Agúndez y cols., 1995b
Colon	Rápido	+		Lang y cols., 1986
	Rápido	+		Hett y cols., 1987
	Rápido	-		Ladero y cols., 1991a
	Rápido		-	Kirling y cols., 1991
	Rápido	+		Roberts-Thomson y cols., 1996
	Rápido (en sigma)		+	Agúndez y cols., 2000
Vejiga	Lento	+		Lower y cols., 1979
	Lento	+		Cartwright y cols., 1982
	Lento	+		Evans y cols., 1983
	Lento	+		Ladero y cols., 1985
	Lento		+	Inatomi y cols., 1999
Estómago	Rápido		+	Ladero y cols., 2001
<u>Otras patologías</u>				
Parkinson	Lento	-		Ladero y cols., 1989
	Lento (presentación precoz)		+	Agúndez y cols., 1998
Escl. Múltiple	Lento	-		Ladero y cols., 1994
Alzheimer	Lento	-		Ladero y cols., 1993a
Artritis reumatoide	Rápido (varones)	-		Ladero y cols., 1993b
	Rápido (hembras)	+		
Psoriasis	Lento	+		Jiménez-Nieto y cols., 1989
Lupus	Lento	-		Ladero 1988

INTRODUCCIÓN

eritematoso				
discoide				
Lupus inducido	Lento		+	Woosley 1978
por fármacos	Lento		+	Strandberg 1976
Mastopatía			-	Ladero y cols., 1987b
fibroquística				

1.5 NAT2 Y DIABETES MELLITUS

El objetivo fundamental de esta Tesis es la posible relación entre el polimorfismo acetilador y la diabetes mellitus. Numerosos estudios se han venido realizando sobre el tema desde hace más de 30 años.

El primer estudio fue realizado por Mattila y Titinen en 1967, los cuales estudiaron el fenotipo acetilador en un grupo de niños diabéticos, encontrando que existía un exceso de metabolizadores rápidos. Posteriormente se realizaron numerosos estudios en diabéticos tipo I y tipo II obteniéndose resultados similares tal y como se puede apreciar en las tablas 5 y 6. En ellas se puede observar que existe un exceso de metabolizadores rápidos tanto entre los diabéticos de tipo I como entre los de tipo II. La asociación del fenotipo rápido es más acusada en los diabéticos tipo I, entre los cuales la asociación es el doble de lo que debería ser por probabilidad. En el caso de los diabéticos tipo II, la asociación no es tan fuerte. Además, numerosos grupos intentaron encontrar asociaciones entre las complicaciones producidas por la diabetes y el fenotipo metabolizador. Burrow y cols. en 1978 comprobaron que no existía asociación entre la neuropatía periférica producida por la diabetes y el fenotipo acetilador. Similares resultados obtuvieron Shenfield y cols. en 1982.

Tabla 5. Relación entre diabetes mellitus tipo I y fenotipo acetilador (Cifras expresadas en número de sujetos estudiados; OR: *Odds Ratio*).

	Diabetes		Control		OR
	Lento	Rápido	Lento	Rápido	
Mattila y Tiitinen, 1967	2	7	43	20	7.58
Shenfield y cols., 1982	12	35	58	54	3.13
McLaren y cols., 1977	22	27	556	375	1.82
Bodansky y cols., 1981	27	28	556	375	1.54
Ladero y cols., 1982	17	15	90	67	1.19
Bonisolli y cols., 1985	57	53	39	16	2.27
Stryjek-Kaminska y cols., 1988	29	51	56	44	2.24

Tabla 6. Relación entre diabetes mellitus tipo II y fenotipo acetilador (Cifras expresadas en número de sujetos estudiados).

	Diabetes		Control		OR
	Lento	Rápido	Lento	Rápido	
Mattila y Tiitinen, 1967	13	6	43	20	0.99
Shenfield y cols., 1982	27	42	58	54	1.67
Burrows y cols., 1978	18	29	556	375	2.39
McLaren y cols., 1977	39	42	556	375	1.60
Ladero y cols., 1982	50	37	90	67	0.99
Bonisolli y cols., 1985	91	55	39	16	1.46
Stryjek-Kaminska y cols., 1988	34	46	56	44	1.72

Sin embargo, McLaren y cols. en 1977 observaron que los diabéticos que presentaban neuropatía diabética tenían un fenotipo acetilador más rápido que los que no sufrían neuropatía periférica y que la población control.

Bodansky y cols. en 1981 observaron que no había relación entre el fenotipo metabolizador y las complicaciones microvasculares de la diabetes tipo I. Posteriormente, Pontiroli y cols. en 1987 obtuvieron los mismos

resultados, concluyendo que no había ninguna relación entre las complicaciones micro o macrovasculares de la diabetes y el fenotipo metabolizador. Tampoco Ladero y cols. en 1982 encontraron ninguna asociación entre el fenotipo metabolizador y las complicaciones de la diabetes. Bonisoli y cols. en 1985 estudiaron la asociación entre el fenotipo acetilador y el fenómeno de “flushing” en relación con la clorpropamida y el alcohol observando que aquellos acetiladores rápidos de tipo II, pero no los de tipo I, presentaban dicho fenómeno con más frecuencia de la esperada.

Sin embargo, no todos los estudios concluyeron que entre los diabéticos existiesen más acetiladores rápidos de lo habitual. Cuando se realizaron estudios en población árabe, los resultados obtenidos fueron diferentes. Hay que hacer constar que una característica de la población diabética de Arabia Saudí es que ellos toleran altas concentraciones de glucosa plasmática sin presentar síntomas (Kingston y Skoog 1986). Evans y cols. realizaron un estudio en pacientes de Arabia Saudí en 1985 obteniendo resultados completamente diferentes de los obtenidos en la población europea, de tal manera que de los 100 pacientes estudiados 73 tenían un fenotipo metabolizador lento (22 diabéticos de tipo I y 51 de tipo II) y tan solo 27 tenían un fenotipo metabolizador rápido (2 diabéticos de tipo I y 25 de tipo II). Entre los controles hubo un 67% de acetiladores lentos y un 33% de acetiladores rápidos. Es decir, se observa una relación entre los acetiladores lentos y la diabetes de tipo I. Esta aparente discordancia entre la población árabe y la caucásica puede hacer pensar en factores que modifiquen la posible asociación del fenotipo acetilador y la diabetes mellitus. Esos factores modificadores, si existiesen, serían diferentes en distintas poblaciones. No obstante existe un factor que se debe determinar previamente, que es si el exceso de acetiladores rápidos observado entre pacientes diabéticos está relacionado con la etiología, o es una consecuencia de la enfermedad. Este factor es el que se analiza en esta Tesis.

2. POLIMORFISMO DEL GEN *CYP2D6*

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL POLIMORFISMO *CYP2D6*

La superfamilia de citocromos P450 es el mayor sistema catalítico implicado en las reacciones de biotransformación de fármacos. Los citocromos P450 son proteínas de membrana que contienen un grupo hemo y que se encuentran situados en el retículo endoplasmático de múltiples tejidos. Estas hemoproteínas guardan una estrecha asociación con una segunda proteína de membrana, la reductasa del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina reducido (NADPH-reductasa), en una relación de alrededor de 10 moléculas de citocromo P450 por cada molécula de reductasa. Esta interacción entre el citocromo P450 y la NADPH reductasa se ve favorecida por hallarse ambos situados en una bicapa lipídica.

Las familias y subfamilias de los citocromos P450, se caracterizan, con pocas excepciones, por la similitud de su secuencia de aminoácidos. De esta manera, los miembros de una misma familia presentan una similitud de más del 40%, y los miembros de una misma subfamilia suelen tener más del 55% (Nelson y cols., 1996).

Los citocromos P450 de mamíferos se dividen en dos clases, dependiendo de la naturaleza del agente reductor y de su localización intracelular. La primera clase está formada por los P450 mitocondriales que se encuentran en el cortex adrenal y están implicados en la síntesis de esteroides. La segunda clase está formada por aquellos que se encuentran principalmente en la membrana del retículo endoplasmático. Estos últimos citocromos P450 se encargan de la degradación oxidativa de sustancias exógenas (González, 1992).

La enzima *CYP2D6* se encuentra sobre todo en hígado, pero también se expresa en otros tejidos como el sistema nervioso central, mama, intestino y riñón (Tyndale y cols., 1991; González 1992). Numerosos fármacos son

metabolizados por dicha enzima. Entre ellos se encuentran: β -bloqueantes, antiarrítmicos, antidepresivos, opiodes, neurolépticos, antianginosos y anfetaminas (Meyer y Zanger, 1997).

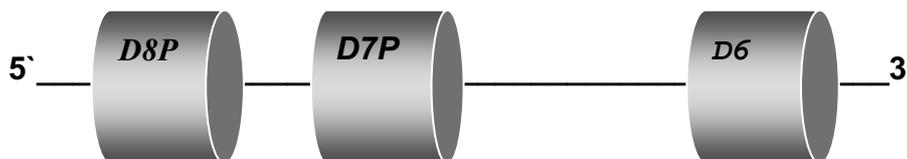
La enzima muestra un polimorfismo genético que divide a la población en metabolizadores lentos (ML; individuos con genes inactivos), rápidos (MR; individuos con uno ó dos genes activos) y ultrarápidos (UR; aquellos que presentan tres ó más genes activos).

Los porcentajes de metabolizadores rápidos y lentos cambian según el diferente origen étnico. Así, el 2-10% de los individuos caucásicos presentan el fenotipo ML (Alvan y cols., 1990). Este porcentaje se reduce a menos del 1% en la población oriental (Bertilsson y cols., 1992). En la población española el 5% de los individuos son homocigotos para alelos mutantes y un 7% de ellos presenta una duplicación genética para el *CYP2D6*. Comparado con otras poblaciones caucásicas se observa que hay un mayor porcentaje de alelos wild-type en la población española (Agúndez y cols., 1994a).

2.2. BASES GENÉTICAS DEL POLIMORFISMO CYP2D6

El locus *CYP2D6* se localiza en la región 22Q13.1 del cromosoma 22 (Eichelbaum y cols., 1987; González y cols., 1988; Gough y cols., 1992). El locus tiene tres genes: *CYP2D6*, *CYP2D7P* y *CYP2D8P* (Kimura y cols., 1989). *CYP2D6* tiene una similitud en la secuencia nucleotídica del 97% con *CYP2D7P* y del 92% con *CYP2D8P*. El gen *CYP2D6* tiene nueve exones. Los nueve exones son típicos de familias de genes que codifican citocromos P450. La posición relativa de los dos pseudogenes y el gen se puede observar en la Figura 5.

Figura 5. Esquema del locus *CYP2D*.



El pseudogen *CYP2D7P* presenta una inserción de T en la posición 226, en el primer exón. Esta inserción altera el marco de lectura y debido a ello su ARNm es incapaz de traducirse a una proteína funcional (Kimura y cols., 1989). Existen tres variantes *CYP2D7P*, *CYP2D7AP* y *CYP2D7BP* (Heim y Meyer, 1992).

El pseudogen *CYP2D8P* contiene múltiples inserciones y deleciones que alteran el marco de lectura (Kimura y cols., 1989).

Las alteraciones responsables del polimorfismo de *CYP2D6* pueden afectar al locus *CYP2D6*. Se puede producir una pérdida (Gaedigk y cols., 1991) o una amplificación del gen (Johansson y cols., 1993). Otras alteraciones responsables del polimorfismo se deben a mutaciones puntuales en la secuencia del gen.

ALTERACIONES DEL LOCUS *CYP2D*

Las alteraciones en el locus *CYP2D* consisten en la pérdida, duplicación y amplificación del gen *CYP2D6* completo:

La mutación *CYP2D6*2x2* produce un aumento en la actividad enzimática *in vivo* que es el resultado de la duplicación del gen *CYP2D6* (Johanson y cols., 1993). Los genes duplicados presentan generalmente tres mutaciones puntuales: G₁₇₄₉C, C₂₉₃₈T y G₄₂₆₈C, que son idénticas a la variante *CYP2D6*2*.

La amplificación es debida a la repetición de esta misma variante, de la que aparecen 3, 4 y hasta 12 copias en un mismo alelo. Aquellos individuos que la portan presentan actividades metabólicas muy altas (Johansson y cols., 1993; Agúndez y cols., 1995c; Aklillu y cols., 1996).

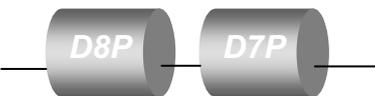
La variante alélica *CYP2D6*5* corresponde a la ausencia completa del gen (Skoda y cols., 1988).

Además de las mutaciones que afectan al gen completo, existen también mutaciones puntuales que pueden dar lugar a tres efectos:

- actividad enzimática normal.
- actividad enzimática alterada.
- ausencia de actividad enzimática.

Figura 6. Esquema de las alteraciones del locus *CYP2D*.

LOCUS NORMAL

PÉRDIDA DEL GEN *CYP2D6*DUPLICACIÓN DEL GEN *CYP2D6*AMPLIFICACIÓN DEL GEN *CYP2D6*

Variante *CYP2D6*1* es el gen normal, sin mutaciones, que codifica la proteína *CYP2D6* funcionalmente activa.

Variante *CYP2D6*2*, produce una pequeña disminución de la actividad de la enzima. Posee una mutación silente y dos mutaciones puntuales que inducen cambios de aminoácidos (Johansson y cols., 1993). Existe una variante *CYP2D6*2B* que contiene la mutación adicional G₁₁₉A.

Variante *CYP2D6*3* que presenta una pérdida de una base, A₂₆₃₇, y causa un cambio en el marco de lectura, que da lugar a la terminación prematura de la síntesis de la proteína (Kagimoto y cols., 1990).

Variante *CYP2D6*4*, la cual presenta 4 subgrupos alélicos:

-*CYP2D6*4A*, con las siguientes sustituciones: C₁₈₈T que produce el cambio de aminoácido Prolina₃₄(Pro)Serina(Ser) y disminuye la actividad enzimática. C₁₀₆₂A da lugar a la sustitución de Leucina₉₁(Leu)Metionina(Met). A₁₀₇₂G da lugar a Histidina₉₄(His)Arginina(Arg). G₄₂₆₈C, origina el cambio Ser₄₈₆Thr. C₁₀₈₅G y G₁₇₄₉C son dos mutaciones silentes. G₁₉₃₄A, es responsable de la falta de expresión de la enzima (Kagimoto y cols., 1990; Gough y cols., 1990; Hanioka y cols., 1990).

-*CYP2D6*4B*: contiene las mismas mutaciones que la anterior, a excepción de la mutación silente G₁₇₄₉C (Kagimoto y cols., 1990).

-*CYP2D6*4C*: posee las mutaciones C₁₈₈T, G₁₇₄₉C, G₁₉₃₄C y G₄₂₆₈C que son comunes a *CYP2D6*4A*, y además la mutación T₃₉₇₄C responsable del cambio Leu₄₂₁Pro (Yokota y cols., 1993).

-*CYP2D6*4D*: junto a las mutaciones G₁₇₄₉C, G₁₉₃₄C y G₄₂₆₈C, aparece C₁₁₂₇T que es silente (Sabbagh y cols., 1996).

En la población caucásica se ha descrito (Agúndez y cols., 1997a) la existencia de alelos de la familia *CYP2D6*4* sin la mutación C₁₈₈T.

Variante *CYP2D6*6*, la cual presenta dos variantes alélicas:

-*CYP2D6*6A*, consiste en la pérdida del nucleótido T₁₇₉₅, que origina el cambio de aminoácido Thr₁₅₂Gly y da lugar a un codón de terminación prematuro en la posición 153 de la proteína que pierde su funcionalidad (Saxena y cols., 1994).

-*CYP2D6*6B*, junto con la mutación de *CYP2D6*A*, tiene una sustitución G₂₀₆₄A, en el exón 4.

Variante *CYP2D6*7*, tiene la sustitución A₃₀₂₃C que cambia el aminoácido His₃₂₄Pro, que ocasiona la pérdida del grupo hemo de la enzima y por tanto una proteína inactiva (Evert y cols., 1994).

Variante *CYP2D6*8*, posee una mutación $G_{1846}T$ que origina la sustitución del aminoácido Gly_{169} y en su lugar se forma un codón de terminación, con la consiguiente falta de producción de la enzima y pérdida de actividad de los sujetos portadores (Broly y cols., 1995).

Variante *CYP2D6*9*, se caracteriza por la pérdida de tres pares de bases al final del extremo 3' del exón 5, $A_{2701}-A_{2703}$, con la pérdida del aminoácido Lys_{281} . El resultado es la producción de una enzima con actividad enzimática ligeramente disminuida con respecto a la actividad normal y con diferentes características cinéticas (Tyndale y cols., 1991a).

Variante *CYP2D6*10* que comprende tres subvariantes alélicas:

-*CYP2D6*10A* presenta la mutación silente $G_{1749}C$, la sustitución $C_{188}T$ que produce el cambio de aminoácido $Pro_{34}Ser$ y la sustitución $G_{4268}C$ que produce $Ser_{486}Thr$. Esta variante da lugar a una enzima con actividad catabólica disminuida, aunque no ausente (Yokota y cols., 1993; Armstrong y cols., 1994).

-*CYP2D6*10B* posee además de las mutaciones anteriores, la sustitución de la base $C_{1127}T$ la cual origina una enzima con baja actividad (Johansson y cols., 1994).

-*CYP2D6*10C*, en ella aparecen las mutaciones: $G_{1749}C$, $G_{4268}C$ y varias mutaciones que indican una conversión a *CYP2D6*7P*; esta variante produce una proteína inestable, prácticamente inactiva (Johansson y cols., 1994; Wang, 1992).

Variante *CYP2D6*11* que tiene cuatro mutaciones puntuales: $G_{971}C$, $G_{1749}C$, $C_{2938}T$ y $G_{4268}C$; es $G_{971}C$ la que origina un mal procesamiento de ARNm, con lo cual no se produce la proteína (Marez y cols., 1995a).

Variante *CYP2D6*12* que consta de cuatro sustituciones de bases: $G_{212}A$, $G_{1749}C$, $C_{2938}T$ y $G_{4268}C$ (Marez y cols., 1995b). La alteración que se relaciona con la inactivación de las proteínas es la $G_{212}A$, la cual resulta en un cambio de aminoácidos: $Gly_{42}Arg$.

Variante *CYP2D6*13* es un híbrido entre *CYP2D6/CYP2D7P*, de modo que el exón 1 pertenece a *CYP2D7P*, provocando un cambio en el marco de lectura que da lugar a la terminación prematura de la traducción en el exón 5 (Panserat y cols., 1995).

Variante *CYP2D6*14* que tiene en su secuencia cuatro sustituciones nucleotídicas: C₁₈₈T, G₁₈₄₆A, C₂₉₃₈T y G₄₂₆₈C que conllevan los respectivos cambios de aminoácidos: Pro₃₄Ser, Gly₂₆₉Arg, Arg₂₉₆Cisteína(Cys) y Ser₄₈₆Thr. El resultado es una proteína enzimáticamente inactiva (Wang, 1992).

Variante *CYP2D6*15* en la que aparece la inserción T₂₂₆ en el primer exón y consecuentemente se produce un cambio en la pauta de lectura. La frecuencia de distribución en la población caucásica es inferior al 1% (Sachse y cols., 1996).

Variante *CYP2D6*16* es un híbrido entre *CYP2D7P* y *CYP2D6*, ya que los exones del 1 al 7 pertenecen a *CYP2D7P*, y los exones 8 al 9 son de *CYP2D6*, el resultado parece ser una proteína enzimáticamente inactiva que daría lugar a un fenotipo ML. Su frecuencia es menor del 1% (Daly y cols., 1996).

Variante *CYP2D6*17* que es portadora de tres sustituciones nucleotídicas: C₁₁₁₁T, C₂₉₃₈T y G₄₂₆₈C, las cuales son responsables de los correspondientes cambios en la secuencia de aminoácidos: Thr₁₀₇Ile, Arg₂₉₆Cys y Ser₄₈₆Thr; la cuarta sustitución de bases es G₁₇₂₆C, que es silente. Esta variante da lugar a una enzima con una actividad catabólica disminuida (Masimirembwa y cols., 1996). La frecuencia de aparición es inferior al 1%.

2.3. VARIACIONES INTERÉTNICAS DEL POLIMORFISMO CYP2D6

El genotipo ML es diferente según la procedencia geográfica, de tal manera que es muy poco frecuente en la mayoría de las poblaciones en las cuales constituye el 1-2% de los individuos, ya sean orientales (Lou y cols., 1987; Lee y cols., 1994) o africanos (Sommers y cols., 1989; Relling y cols., 1991). Sin embargo, en caucásicos dicho porcentaje se eleva hasta un 5-10%. Estas variaciones se deben a que las frecuencias de las distintas variantes alélicas cambian de unas poblaciones a otras, como se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 7. Distribución de frecuencias de distintas variantes alélicas de *CYP2D6* en diversas poblaciones (Agúndez y cols., 1997a).

Población	CYP2D6*1	CYP2D6*2	CYP2D6*3	CYP2D6*4	CYP2D6*5	CYP2D6*9	CYP2D6*10
Nicaragüenses	70.1	1.1	1.8	15.7	3.6	4.4	3.3
Orientales	41.5	1.3	-	0.8	5.7	-	50.7
Blancos Americanos	76	-	2.0	19.0	3.0	-	-
Españoles	73	3.3	0.9	12.0	1.7	2.9	6.2
Suecos	59.8	1.0	2.0	32.7	4.5	-	-
Etíopes	73.3	13.6	-	1.2	3.3	-	8.6

2.4. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO CYP2D6 CON DIFERENTES PATOLOGÍAS

El polimorfismo CYP2D6 al igual que el de NAT2 también se ha relacionado con diferentes patologías. En unos casos la mayoría de los estudios presentan conclusiones similares y en otros existen discrepancias. Entre aquellas patologías con las cuales se ha relacionado el polimorfismo

CYP2D6 se encuentran la enfermedad de Parkinson, el cáncer de pulmón y el cáncer de vejiga.

En lo que respecta al cáncer de pulmón hay numerosos estudios publicados. Bouchardy y cols. en 1996 encontraron que aquellos fumadores con actividad alta de la enzima CYP2D6 y alto consumo de tabaco presentaban un riesgo más alto de sufrir cáncer de pulmón. También se han publicado otros estudios que observan que aquellos individuos que son MR tienen aumentado el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Esta asociación podría deberse a que la enzima CYP2D6 puede activar un componente del tabaco denominado 4-(N-metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), que es mutagénico.

En lo referente a la relación con el cáncer de vejiga existen estudios contradictorios. En uno de ellos (Benítez y cols., 1990a) se observa que aquellos pacientes que sufrían cáncer de vejiga tenían una capacidad más alta de oxidación de la enzima CYP2D6 que los individuos sanos. Otros estudios posteriores no confirmaron esta asociación.

Otros tipos de cáncer estudiados han sido el de mama y el de hígado. En lo que respecta al cáncer de mama existen algunos estudios en los que se les ha relacionado con un el status oxidativo lento. En el caso de cáncer de hígado se ha observado lo contrario.

Tabla 8. Relación entre el status oxidativo y distintas patologías.

Patología	Status	Análisis fenotipo	Análisis genotipo	Referencia
<u>Cáncer</u>				
Pulmón	Rápido	+		Caporaso 1990
	Rápido	+		Benítez 1991
	Rápido		+	Agúndez 1994b
	Rápido		-	Laforest 2000
Hígado	Rápido		+	Agúndez 1995d
Mama	Lento	+		Ladero 1991b
	Lento		+	Ladona 1996
Colon	Rápido	-		Ladero 1991c
Vejiga	Rápido	+		Benítez 1990a
	Rápido		-	Spurr 1995
<u>Otras patologías</u>				
Parkinson	Rápido	-		Benítez 1990b
	Rápido		-	Joost 1999
Alzheimer	Rápido	-		Benítez 1993
	Rápido		-	Atkinson 1999
Temblor esencial	Rápido		-	Agúndez 1997b
Esclerosis múltiple	Rápido		-	Agúndez 1995e
Enfermedad inflamatoria intestinal	Rápido	-		Ladero 1995

2.5. CYP2D6 Y DIABETES MELITUS

La posible relación entre diabetes melitus y CYP2D6 ha sido menos estudiada que la relación entre NAT2 y diabetes mellitus. Kallio y cols. realizaron un estudio en 54 individuos con diabetes mellitus insulín-dependiente (DMID) y en 42 individuos con diabetes mellitus no insulín-dependiente (DMNID) y observaron que no existían diferencias significativas con respecto a los voluntarios sanos. Encontraron un bajo porcentaje de metabolizadores lentos en ambos grupos de diabéticos (uno en los de tipo I y ninguno en los de tipo II), pero llegaron a la conclusión que el metabolismo oxidativo no se encontraba alterado en ninguno de los dos tipos de diabetes.

Otros estudios posteriores han obtenido resultados similares. De esta manera Hegele y cols. estudiaron la población de Oji-Cree en Canada. Dicha población se caracteriza por tener una de las prevalencias de DMNID más altas del mundo. Estudiaron a 112 individuos con DMNID y a 481 individuos sin ella. Tan solo estudiaron la mutación G1934A del polimorfismo CYP2D6, no encontrando ninguna variación entre los individuos diabéticos y los que no lo eran. En 1997 Gawronska-Szklarz y cols. estudiaron 84 diabéticos tipo II observando que todos ellos presentaban un fenotipo oxidativo rápido.

Aunque los resultados globales apuntan hacia una falta de asociación entre el fenotipo CYP2D6 y la diabetes mellitus, debe tenerse en cuenta que los estudios realizados, o bien corresponden a grupos de pacientes y controles demasiado pequeños para obtener conclusiones definitivas o bien no corresponden a poblaciones caucásicas. Por este motivo nos hemos planteado analizar el genotipo *CYP2D6* en relación con la diabetes mellitus tipo 2 en esta Tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis es el análisis de cualquier posible asociación de los polimorfismos de dos enzimas metabolizadoras de fármacos y sustancias exógenas y la diabetes mellitus tipo 2. Como se comentó en el capítulo de Introducción existe abundante bibliografía respecto a la asociación del polimorfismo NAT2 y la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, la inmensa mayoría de esta información está basada en estudios de fenotipo, en los que se analiza la capacidad acetiladora en los pacientes y se compara con la de los individuos sanos. Este tipo de estudios revelan una mayor frecuencia de acetiladores rápidos en los pacientes que en los controles. Sin embargo, estos resultados podrían ser debidos a la propia patología o a los tratamientos intercurrentes que podrían modificar la capacidad acetiladora en los pacientes, falseando así los resultados. Por este motivo en el diseño de este estudio se decidió obviar estos factores realizando un estudio del genotipo, que no puede ser modificado por la propia diabetes, sus complicaciones o cualquier tratamiento farmacológico. Con respecto al estudio de CYP2D6 la bibliografía sugiere que no hay asociación. No obstante se ha incluido el estudio de este polimorfismo con un doble objetivo: En primer lugar confirmar dicha falta de asociación y en segundo lugar para tener un control de homogeneidad genética independiente del polimorfismo NAT2, entre los pacientes y los controles de este estudio.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar el genotipo *NAT2* en una población española de pacientes con diabetes tipo 2 y en un grupo de controles sanos, con el fin de comparar la frecuencia de alelos *NAT2* mutados y el fenotipo acetilador inferido entre ambas poblaciones.
2. Analizar el genotipo *CYP2D6* en una población española de pacientes con diabetes tipo 2 y en un grupo de controles sanos, con

OBJETIVOS

el fin de comparar la frecuencia de alelos *CYP2D6* mutados y el fenotipo oxidativo inferido entre ambas poblaciones.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. SUJETOS

Ciento once pacientes (59 hombres y 52 mujeres) con DMNID fueron incluidos en este estudio. Todos ellos eran pacientes que acudían a consulta y fueron seleccionados consecutivamente. Todos los pacientes a los que se les propuso participar en este estudio aceptaron. Sus edades estaban comprendidas entre 42 y 90 años, la edad media fue de 67, con una desviación estándar (DS) de 12. La mayoría de ellos (78 individuos) no tenían historia familiar de DMNID.

Doscientos diecisiete voluntarios sanos (100 hombres y 117 mujeres) que dieron consentimiento informado fueron incluidos en este estudio como controles. Fueron reclutados entre los estudiantes y los profesores de la Facultad de Medicina de Badajoz. El porcentaje de participación entre los sujetos requeridos fue superior al 95%. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz.

2. METODOS

2.1. MATERIAL DE LABORATORIO

- Agitador Heidolph.
- Aparato de electroforesis submarina Pharmacia, modelo GNA200.
- Autoclave P-SELECTA.
- Balanza PRECISA, modelo 1000C-3000D.
- Balanza Mettler, modelo H31AR.
- Baños termostatzados Tectron, modelos 3473100 y 300054.
- Baño con agitación SELECTA, modelo Unitronic.
- Campana extractora de gases CAPTAIR, modelo 4007A.
- Centrífugas Heraeus, modelo Biofuge 13 y Megafuge 1.0R.

- Digitalizador de imagen Gel Doc 1000 de BIO-RAD.
- Espectrofotómetro BAUSCH & LOMB, modelo Spectronic 2
- Fuente de alimentación multidrive XL Pharmacia.
- Membranas de nylon cargadas positivamente de Boehringer Mannheim número de catálogo 1209272.
- pH-metro BECKMAN
- Pipetas automáticas Gilson (P10, P20, P100, P200, P1000 y P5000).
- Termociclador 480 Perkin-Elmer.
- Transiluminador Macrouve, LKB 2111.
- Tubos Eppendorf 1.5 ml DASLAB.
- Tubos Falcon estériles de 50 y 15 ml BECTON DICKINSON.
- Tubos GeneAmp Perkin-Elmer Cetus.
- Vórtex Heidolph, Reax 2000.

2.2. REACTIVOS

- Acetato amónico MERK.
- Acetato potásico, SIGMA.
- Acetato sódico PANREAC.
- Acetonitrilo MERCK.
- Aceite mineral SIGMA.
- Acido acético glacial MERCK.
- Acido maleico SIGMA.
- Acido clorhídrico MERCK.
- Acido perclórico PANREAC.
- Agarosa BIO-RAD.
- Agua purificada a través del sistema MilliQ de millipore.
- Bicarbonato potásico MERCK.
- Bicarbonato sódico MERCK.

- Bromuro de etidio BIO-RAD.
- Citrato sódico SIGMA.
- Cloroformo MERCK.
- Cloruro de amonio MERCK.
- Cloruro potásico SIGMA.
- Cloruro sódico SIGMA.
- Desoxinucleótidos trifosfato Boehringer Mannheim.
- Dietileter, MERCK
- Dodecil sulfato sódico (Sigma Chem. Co.).
- EDTA (Sigma Chem. Co.).
- Endonucleasas de restricción: *EcoRI* y *XbaI*. Boehringer Mannheim.
- Equipo de detección y marcaje del ADN con digoxigenina, Boehringer Mannheim.
- Etanol puro MERCK.
- Fenol MERCK.
- Formamida SIGMA.
- Fosfato potásico SIGMA.
- Glucosa SIGMA.
- Hidróxido sódico MERCK.
- 8-hidroxiquinolena MERCK.
- Isoamilalcohol MERCK.
- Isopropanol MERCK.
- Leupeptina SIGMA.
- Metanol MERCK.
- MOPS SIGMA.
- Oligonucleótidos Perkin-Elmer y Pharmacia.
- 2-Propanol MERCK.
- Proteinasa K Boehringer Mannheim.
- Sacarosa MERCK.

PACIENTES Y MÉTODOS

- Sonda (cDNA completo de CYP2D6 humano), cedida por el profesor U. A. Meyer, Basilea, Suiza.
- Sulfato de magnesio SIGMA.
- Taq polimerasa Boehringer Mannheim.
- Tripsina SIGMA.
- Tris-HCl MERCK.
- Tritón X-100 Bio-Rad.
- Tween 20 Boehringer Mannheim.

2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.3.1. PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO

El DNA usado en este estudio proviene de leucocitos sanguíneos y se obtuvo de la siguiente forma:

1. Se extrajeron 15 ml de sangre venosa de cada voluntario mediante tubos Venoject.

2. Las muestras se depositan en tubos Falcon de 50 ml y se añaden tres volúmenes de tampón de hemólisis almacenado a 4°C. Se agitó suavemente durante 20 minutos.

3. Se centrifuga a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C para que los leucocitos sedimenten. En el sobrenadante quedan proteínas y restos de eritrocitos que se eliminan posteriormente por decantación.

4. Se añaden 20 ml de tampón de hemólisis, se agita y se centrifuga. Se decanta el sobrenadante del mismo modo que en pasos anteriores.

5. Se secan bien las paredes del tubo para que no queden restos de sobrenadante y se añaden al sedimento de leucocitos 5 ml de solución SE. Se resuspende en ella el sedimento.

La purificación del DNA puede detenerse en este momento congelando las muestras a -80°C.

6. Se añaden 150 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 250 µl de SDS al 20%. Se agita suavemente de 8 a 24 horas a temperatura ambiente.

Para todos los pasos que vienen a continuación los tiempos de agitación son de 20 minutos a 25 rpm, y la centrifugación es de 10 minutos a 5000 x g y a 4°C.

7. Se añade a la solución que contiene el DNA la misma cantidad de fenol a 4°C. Se agita y centrifuga.

8. Se observan dos fases claramente diferentes, la superior contiene

los ácidos nucleicos. Se extrae con cuidado de no arrastrar nada de la fase inferior de fenol y se deposita en un nuevo tubo Falcon de 50 ml estéril.

9. Se añade el mismo volumen de una solución de fenol/cloroformo (1:1). Se agita y se centrifuga. La fase superior se extrae y se pasa a un tubo Falcon de 50 ml estéril.

10. A esta fase se le añade el mismo volumen de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se agita, centrifuga y se extrae la fase superior que se pone en un tubo Falcon de 50 ml estéril.

11. Se añade un volumen igual de isopropanol. Se agita suavemente hasta que se hagan visibles los filamentos de DNA. Poco a poco se va formando un flóculo con estos filamentos.

12. Se extrae el flóculo con la punta de una pipeta Pasteur previamente doblada en el mechero Bunsen. Se lava con etanol al 70% y a -20°C con el fin de arrastrar las impurezas. Para aprovechar toda la cantidad de DNA, es necesario romper la punta de la pipeta dentro de un vial de plástico nuevo y estéril.

13. Se evaporan los restos de etanol en la campana de vacío durante 10 minutos. Se añaden 500 µl de solución TE a pH 8, y se agita durante 24 horas a 4°C y a 5 rpm.

14. Se almacena el DNA a 4°C hasta su uso.

Soluciones utilizadas en la purificación de DNA:

-Fenol:

El fenol es muy caústico y tóxico, se debe evitar cualquier contacto con la piel y mucosas. Hay que manejarlo con sumo cuidado, protegido con guantes y en la cámara de extracción de gases.

1. Se incuba a 68°C entre 1 y 2 horas.
2. Se añade 1 g de 8-hidroxiquinolina por Kg de fenol y se agita bien.

3. Se añade 500 ml de Tris 0.5M sin ajustar el pH.

4. Se agita a 4°C durante 24 horas como máximo. Se deja sedimentar durante una hora y se mide el pH de la fase superior, si es mayor de 7.8, se puede almacenar a 4°C.

5. Si el pH es más bajo de 7.8, se retira la fase superior por aspiración y se añaden otros 250 ml de Tris 1 M pH 8.

6. Se repiten los pasos 4 y 5 tantas veces como sea necesario hasta que el pH sea de 7.8 o superior.

El fenol puede almacenarse a -20°C si no va a usarse en el plazo de uno o dos meses. Antes de usarlo es aconsejable medir su pH y ajustarlo con Tris en caso necesario.

-Tampón de hemólisis:

NH₄Cl 155mM

KHCO₃ 10mM

EDTA 0.1mM

Ajustar a pH 7.4 con NaOH. Autoclavar y almacenar a 4°C.

-Solución SE:

15 ml de NaCl 5M pH 8

50 ml de EDTA 0.5M pH 8

Autoclavar.

-Proteinasa K:

10 mg/ml en agua MilliQ estéril. Sólo se prepara la cantidad que vaya a utilizarse. Almacenar a 4°C durante dos días como máximo.

-SDS (dodecil sulfato sódico):

20% peso/volumen en agua MilliQ estéril.

Filtrar.

-Solución TE:

10mM de Tris pH 8

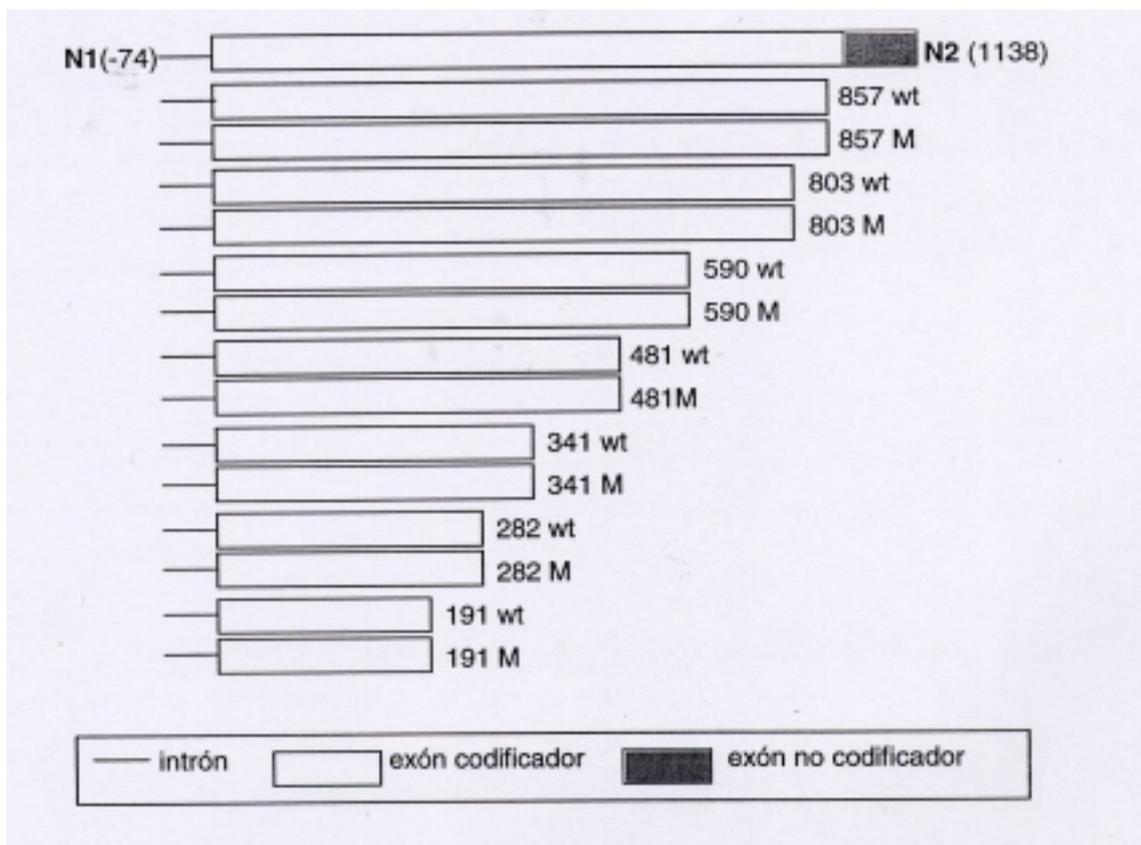
1mM de EDTA pH 8

Autoclavar.

2.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE DNA (PCR) (ACETILACIÓN)

El método se basa en dos niveles de amplificación. Primero se realiza una amplificación del gen completo y de regiones adyacentes 5' y 3', y posteriormente se realiza para cada mutación estudiada, un par de reacciones de amplificación utilizando oligonucleótidos específicos para secuencias mutadas y no mutadas. Un esquema del procedimiento se muestra en la figura siguiente:

Figura 7. Reacciones de amplificación por PCR para la detección de mutaciones puntuales en el gen NAT2.



2.3.2.1. AMPLIFICACIÓN INESPECÍFICA

La primera reacción amplifica un fragmento de 1213 pb que incluye el exón codificador de NAT2. Los oligonucleótidos usados (N1 y N2) se sitúan fuera de la región donde se producen habitualmente las mutaciones, se trata por lo tanto de una reacción de amplificación no influenciada por las mutaciones del gen. La secuencia de los oligonucleótidos se escogió en aquellas zonas donde existían más diferencias de bases entre NAT2, y genes relacionados como NAT1 y NATP. De este modo se evitan posibles amplificaciones inespecíficas.

Oligonucleótido N1: 5'-AATTAGTCACACGAGGA-3' abarca las posiciones -74 a -58 del gen.

Oligonucleótido N2: 5'-TCTAGCATGAATCACTCTG-3' abarca las posiciones 1120 a 1138.

La composición de la mezcla de la reacción de amplificación era:

-200-400ng de DNA genómico

-50nM de oligonucleótidos N1 y N2

-200µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)

-10mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM de MgCl₂, 50mM KCl, 0.1 mg/ml de gelatina

-2.5 U de Taq polimerasa

-Agua MilliQ estéril hasta alcanzar un volumen de 25 µl.

Toda la mezcla se agita y centrifuga durante varios segundos. Finalmente se le añade una gota de aceite mineral para evitar la evaporación causada por las altas temperaturas durante la reacción de amplificación.

Se colocan los tubos en el termociclador y comienza la reacción en las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización a 94°C durante 90 segundos.

Treinta y cinco ciclos con los siguientes pasos:

2. 94°C durante 60 s.

3. 49°C durante 90 s.

4. 72°C durante 90 s.

5. Finalizados los ciclos se hace un último paso de extensión de 7 minutos a 72°C para conseguir una total polimerización de todas las cadenas de DNA.

Se analiza el producto de la reacción (9µl) en un gel de agarosa teñido con 10 µl (10 mg/ml) de bromuro de etidio.

2.3.2.2. AMPLIFICACIÓN ESPECIFICA

Gracias a estas reacciones se detectan mutaciones puntuales a lo largo del gen. Ya que cada individuo posee una pareja de genes, son necesarias dos reacciones independientes por cada mutación analizada. Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron a partir de la secuencia de bases que abarca la posible mutación y adyacentes. Se diseñaron por lo tanto dos, uno para el alelo Wt y otro para el alelo mutado de cada posición. La longitud de los nucleótidos venía definida por la temperatura de hibridación. Se buscó la más adecuada para utilizar cada oligonucleótido en combinación con el oligonucleótido N1.

Oligonucleótido 857G: 5'-AATAGTAAGGGATC-3' 870 a 857

857A: 5'-AATAGTAAGGGATT-3' 870 a 857

Oligonucleótido 803A: 5'-GGAAATCTTAAATATATTT-3' 821 a 803

803G: 5'-GGAAATCTTAAATATATTC-3' 821 a 803

PACIENTES Y MÉTODOS

Oligonucleótido 590G: 5'-CAAAATCTTCAATTGTTC-3'	607a 590
590A: 5'-CAAAATCTTCAATTGTTT-3'	607 a 590
Oligonucleótido 481 C: 5'-CCTGATTTGGTCCAG-3'	495 a 481
481T 5'-CCTGATTTGGTCCAA-3'	495 a 481
Oligonucleótido 341T: 5'-ATTCCTGCCGTCAA-3'	354 a 341
341C: 5'-ATTCCTGCCGTCCAG-3'	354 a 341
Oligonucleótido 282C: 5'-GTAACTGGAGGGATG-3'	297 a 282
282T: 5'-GTAACTGGAGGGATA-3'	297 a 282
Oligonucleótido 191G: 5'-ACCACCCACCCC-3'	202 a 191
191 A: 5'-ACCACCCACCCT-3'	202 a 191

Las condiciones y reactivos de la reacción son:

- 1 μ l de DNA de la reacción N.
- 50 nM de oligonucleótido N1.
- 50 nM de oligonucleótido específico para cada mutación y 50 nM. secuencia wt (en tubos diferentes).
- 100 μ M de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP).
- 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM de MgCl₂, 50mM KCl y 0.1 mg/ml de gelatina.
- 1.25 U de Taq polimerasa.
- Agua MilliQ estéril hasta alcanzar un volumen de 25 μ l.

Las condiciones de amplificación para todas las reacciones son: 1 minuto a 94°C, después la reacción se sitúa a la temperatura de hibridación específica para cada reacción durante 1 minuto y finalmente a 72°C durante

otro minuto. Cada par de reacciones tiene su temperatura de hibridación y número de ciclos diferentes, que se eligieron cuidadosamente para lograr un grado de discriminación máximo entre secuencias mutadas y no mutadas. Estas temperaturas y el número de ciclos son:

Mutación 857: 44°C y 18 ciclos.

Mutación 803: 48°C y 15 ciclos.

Mutación 590: 56°C y 15 ciclos.

Mutación 481: 50°C y 14 ciclos.

Mutación 341: 52°C y 17 ciclos.

Mutación 282: 54°C y 14 ciclos.

Mutación 191: 47°C y 18 ciclos.

Por este método cualquier producto PCR puede ser analizado posteriormente e identificar en él otras posibles mutaciones. De esta manera podemos averiguar las asociaciones de mutaciones en un mismo alelo. Las reacciones específicas se realizan en sentido 3'-5', es decir, la primera que se realiza es la 857 y la última la 191. En el momento en que se detecta una discrepancia en la secuencia (heterozigosidad) en cualquier posición (y por lo tanto dos productos de PCR distintos, cada uno correspondiente a un alelo) el resto de mutaciones pueden ser analizadas por separado en cada alelo.

2.3.3 PCR ALELO-ESPECÍFICO (OXIDACIÓN)

Se ha utilizado esta técnica para la detección de mutaciones puntuales en la secuencia del gen *CYP2D6*, en concreto para la detección de las mutaciones: *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*9*.

Para ello se han diseñado oligonucleótidos específicos de las regiones de los intrones a ambos lados de las mutaciones de interés (Heim y Meyer, 1993). Estas reacciones de PCR se llevan cabo en 2 etapas; en la primera, para evitar amplificaciones incorrectas de cualquiera de los otros dos pseudogenes (*CYP2D7P* y *CYP2D8P*), se realiza una amplificación de dos regiones del gen *CYP2D6* utilizando oligonucleótidos que hibridan en secuencias específicas de *CYP2D6* y que no están presentes en los pseudogenes. Son las reacciones denominadas A y B. En una segunda etapa se lleva a cabo una amplificación selectiva para secuencias Wt ó mutadas.

Para las primeras reacciones inespecíficas se utilizan los siguientes oligonucleótidos:

Reacción A:

-Oligonucleótido DB-1: ATT TCC CAG CTG GAA TCC. Corresponde al intrón 2, desde la posición 1385 a la 1402.

-Oligonucleótido DB-2: GAG ACT CCT CGG TCT CTC. Corresponde al intrón 4, desde la posición 2122 a la 2105.

Reacción B:

-Oligonucleótido DB-3: GCG GAG CGA GAG ACC GAG GA. Corresponde al intrón 4, desde la posición 2098 a la 2117.

-Oligonucleótido DB-4: CCG GCC CTG ACA CTC CTT CT. Corresponde al intrón 6, desde la posición 3200 a la 3181.

Las reacciones se realizan independientemente, en un volumen total de 25 µl, en presencia de 200-400 ng de ADN genómico, 50 nM de cada oligonucleotido, 200 µl de cada deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),

10 mM de Tris-HCl, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 0.1 mg/ml de gelatina y 2.5 unidades de Taq polimerasa, el pH de la solución es de 8.3. A cada tubo de reacción se añade una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras.

En un primer paso se realiza una desnaturalización de 90 segundos a 94°C, a la que le siguen 35 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 52°C, 90 segundos a 72°C y un periodo de extensión final de 7 minutos a 72°C. Al final de cada reacción se cargan 10 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.2%, para comprobar que la amplificación ha sido correcta, se observarán unos tamaños de banda de 738pb para la reacción A y 1103 pb para la reacción B. Se utiliza 1 µl de esa reacción para realizar la segunda tanda de reacciones de PCR específico.

Para detectar la mutación *CYP2D6*4*, se llevan a cabo 2 reacciones simultáneas a partir del producto amplificado en A. En el tubo de una reacción se añade el oligonucleótido DB-1 y el específico DB-7 (CGA AAG GGG CGT CC); y en el de la otra reacción, junto al DB-1 se pone el específico DB-8 (CGA AAG GGG CGT CT).

El fragmento B se emplea dos veces, una para detectar la variante *CYP2D6*3* y la otra para la detección de la variante *CYP2D6*9*. En el caso de la variante *CYP2D6*3*, se vuelven a realizar un nuevo par de reacciones de tal manera que en un tubo se pondrá el oligonucleótido común DB-4 junto al específico DB-5 (GCT AAC TGA GCA CA), y en el otro de nuevo DB-4 y el específico DB-6 (GCT AAC TGA GCA CG). En referencia a *CYP2D6*9*, en el par de reacciones empleadas para su detección, nuevamente se utiliza el oligonucleótido común DB-4 junto al DB-9 (GGC AGA GAT GGA GA) en una reacción, y en la otra DB-4 y DB-10 (GGC AGA GAT GGA GG) (Tyndale y cols., 1991b). Estas reacciones se llevan a cabo con 15 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 52°C y 60 segundos a 72°C. Al finalizar la reacción se cargan 10 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.2%,

observándose los siguientes fragmentos: 577 pb, 563 pb y 500 pb respectivamente.

La interpretación de los resultados está en función de la aparición ó no de la banda amplificada con el tamaño adecuado. De tal manera que si la banda aparece en el tubo donde se ha utilizado el oligonucleótido silvestre (Wt) y por el contrario no aparece en el tubo el oligonucleótido mutado, se interpretara que este sujeto es homocigoto para la secuencia Wt estudiada. Si se detectan bandas en ambos tubos se trata de un individuo heterocigoto para la mutación en cuestión. Si ocurriera amplificación en el tubo del oligonucleótido mutado, y no en el oligonucleótido sin mutar, se trata de un individuo homocigoto para la mutación estudiada.

2.3.4 RFLP (POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN)

Las variantes alélicas que detectamos por este procedimiento son *CYP2D6*2* y *CYP2D6*5*, las cuales no consisten en mutaciones puntuales, sino que afectan a todo el gen y por lo tanto dan lugar a cambios de varios miles de bases en el locus *CYP2D*, que son fácilmente detectables por electroforesis.

1. Se ponen 15 µg de ADN genómico en un tubo estéril y se le añade el tampón adecuado según la endonucleasa empleada.
 - Se añaden 20 unidades de la endonucleasa (*XbaI* ó *EcoRI*, en este estudio). Se digieren las muestras a 37°C durante toda la noche.
 - A continuación se añaden 10 unidades más de enzima y se incuba dos horas más.
2. Al final de la digestión se añade 1/10 volumen del tampón de carga (50% de glicerol, 50% de agua, 0.25% de xileno cianol) y se separan los fragmentos de ADN por electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% en una cámara de electroforesis con 1x de T.B.E. (EDTA 1 mM, Tris 100 mM, ácido bórico 88 mM, pH=8) a un voltaje de 20 v/h durante 48 horas.
3. Transcurrido ese tiempo el gel es teñido con bromuro de etidio. Para ello se sumerge el gel en 200 ml de agua que contienen 15 µl de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml, durante 30 minutos. Se fotografía el gel, sobre un transiluminador de luz ultravioleta, sobreponiendo una regla a la altura de los pocillos, para poder realizar más tarde una recta patrón que nos permita conocer el tamaño de las bandas.
4. A continuación se desnaturaliza el gel en una solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), durante 30 minutos. De

tal manera que las bandas de ADN de doble hélice se separen.

5. Se deshecha la solución desnaturalizante y se le añade la solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris 1 M, pH=7), 30 minutos.
6. Mientras el gel está en los pasos anteriores, se va cortando la membrana de nylon, cargada positivamente con el mismo tamaño que el gel, y se deja en agua 5 minutos antes de usarla. Después se sumerge en 10x de SSC (NaCl 1.5 M, citrato sódico 0.15 M, pH=7) hasta su uso.
7. Para transferir el ADN a la membrana se prepara en una bandeja un soporte sobre el que se colocan un par de papeles Whatman del mismo tamaño del gel, sobre ellos se pone el gel, a continuación la membrana de nylon y sobre estas toallas de papel. Por encima de todo se coloca una placa de cristal sobre la que se pone un peso aproximado de 500 g. Se deja que se de la transferencia como mínimo de 6 a 8 horas.
8. A continuación se enjuaga la membrana de nylon, que ahora contiene el ADN transferido, en 6x SSC, 2 minutos, se deja secar entre papeles de filtro limpios. Posteriormente se pone en un horno a 80°C durante 1-2 horas para fijar el ADN a la membrana.
9. Se introduce la membrana en un tubo de vidrio HYBAID modelo HB-OV-BL, junto con la solución de prehibridación (SSC 5x, 2% de reactivo bloqueo, 0.1% de N-laurilsarcosina, 0.2% SDS, 50% formamida). Se deja al menos 6 horas a 42°C en constante agitación.
10. La solución de hibridación empleada se guarda para posteriores usos. Al tubo que contiene la membrana se le añade la solución de hibridación (10 ml de solución de prehibridación que lleva la sonda con el gen *CYP2D6*, marcada por el método de dioxigenina de Boehringer-Mannheim).

Tras la hibridación la membrana se lava de la siguiente forma:

1. 100 ml de SSC 2x y 0.1% de SDS a temperatura ambiente, 5 minutos.
2. 100 ml de SSC 2x y 0.1% de SDS a temperatura ambiente, 5 minutos.
3. 100 ml de SSC 0.1x y 0.1% de SDS, durante 15 minutos a 42°C.
4. 100 ml de SSC 0.1x y 0.1% de SDS, durante 15 minutos a 42°C.
5. Se lava ligeramente la membrana con 100 ml de buffer-1 (ácido maleico 0.1 M, ClNa 0.15 M, pH=7) y 0.3% de Tween 20 (v/v), durante 1-5 minutos.
6. Se incuba durante 30 minutos con 100 ml de buffer-2 (solución de bloqueo 1:10 en buffer 1).
7. Se deshecha la solución anterior y se incuba con anticuerpo conjugado diluido 1:5000 en el buffer-2, durante 20 minutos.
8. Se lava el anticuerpo conjugado 2 veces con 100 ml de buffer-1 y Tween 20 al 0.3%, durante 15 minutos.
9. Se equilibra la membrana durante 2 minutos con 20 ml de buffer-3 (ClNa 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M, cloruro magnésico 50 mM, pH=9.5).
10. Se incuba la membrana con 10 ml de la solución color, recién preparada: 45 µl de NBT (nitroblue tetrazolium salt, 75 mg/ml en dimetilformamida) y 35 µl de X-phosphate (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato, 50 mg/ml de dimetilformamida) se añaden a 10 ml de buffer-3.

Para que se empiece a ver el precipitado de color hay que poner la membrana en un lugar oscuro. El color empieza a aparecer después de unos minutos del inicio y no es completado hasta pasadas 16 horas.

11. Cuando las bandas son visibles se para la reacción decantando

PACIENTES Y MÉTODOS

la solución de color y añadiendo agua MilliQ o buffer-4 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH=8) durante 5 minutos.

12. Los filtros pueden ser secados a temperatura ambiente o en horno a 80°C y guardados.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El 95% de los límites de confianza fueron establecidos de acuerdo con Bulpitt (1987). La prevalencia de las diferentes variantes alélicas entre los pacientes con DMNID y los controles sanos fue establecida mediante el test de la Chi Cuadrado, a menos que las condiciones para la aplicación de dicho test no fueran las adecuadas. En esos casos se utilizó el test de Fisher.

RESULTADOS

RESULTADOS**NAT2**

En total se genotiparon 109 individuos con DMNID, es decir, estudiamos 218 genes presentes en otros tantos cromosomas correspondientes a los pacientes. Además, utilizamos como grupo control para poder establecer resultados comparativos, un grupo de 215 individuos sanos que habían sido genotipados previamente por nuestro equipo. Las 7 mutaciones estudiadas (191A, 282T, 341C, 481T, 590A, 803G y 857A) estaban presentes en los cromosomas de los 215 individuos sanos utilizados como control y todas ellas, a excepción de la 191A, estaban también presentes entre los 109 pacientes con DMNID. En la Tabla 9 se pueden observar las frecuencias de las distintas mutaciones estudiadas en los pacientes y en los controles.

Tabla 9. Frecuencia de las mutaciones de *NAT2* analizadas (IC: Intervalo de confianza).

Mutaciones	Pacientes		Controles		OR	95% IC
	Num	(%)	Num	(%)		
191A	0	0	2	0.24		
282T	64	19	112	13.6	1.24	0.86-1.79
341C	92	27.3	198	24	0.86	0.62-1.19
481T	92	27.3	198	24	0.86	0.62-1.19
590A	62	18.4	110	13.3	1.16	0.80-1.66
803G	54	16	200	24.3	0.38	0.26-0.54
857	2	0.59	3	0.36	1.32	0.26-6.73
Total mutaciones	366		823			

Puede observarse que el número de mutaciones excede con mucho el número de genes estudiados. Ello es debido a que las mutaciones en el gen *NAT2* suelen aparecer asociadas en grupos de 2 ó 3, en el mismo gen.

Se aprecia como aparecen con alta frecuencia mutaciones que son comunes en población blanca (282T, 481T, 341C, 590A y 803G) y por el contrario la frecuencia de mutaciones que afectan a las posiciones 191 y 857 es muy baja a diferencia de lo descrito en sujetos negros y orientales, respectivamente (Bell y cols., 1993; Deguchi y cols., 1990).

En la Tabla 10 se muestran por separado las mutaciones que aparecen en genes rápidos y aquellas que están en genes lentos en los pacientes con DMNID. Hay que hacer notar que una de las mutaciones (803G) aparece indistintamente en genes lentos o rápidos en función de que vaya asociada o no a otras mutaciones. También ocurre lo mismo con la mutación 481T la cual aparecerá en genes lentos o rápidos según vaya o no asociada a mutaciones no funcionales. Por ejemplo el alelo *NAT2*12C* presenta la mutación 481T y sin embargo, se considera un alelo rápido, puesto que en este caso esta mutación no va acompañada de otras no funcionales. Entre los pacientes con DMNID no hemos observado la mutación 481T asociada a alelos rápidos.

Se identificaron 6 variantes alélicas diferentes en el gen *NAT2* en el grupo de pacientes analizados y 7 en los individuos utilizados como control. Así, cabría la posibilidad de encontrar 30 y 42 genotipos diferentes, respectivamente, en cada uno de los grupos. Sin embargo, sólo observamos 9 y 11 genotipos en cada uno de ellos, debido a que algunas de las variaciones alélicas encontradas son extremadamente raras en la población blanca y aparecieron en porcentajes muy pequeños. Otras, ni tan siquiera lo hicieron. De hecho tan solo hallamos 6 variantes alélicas de las 21 que están descritas en la actualidad.

Tabla 10. Frecuencia de mutaciones de *NAT2* presentes en genes rápidos y lentos en los pacientes con DMNID y en el grupo control.

Mutación	Pacientes		Controles		OR	95% IC
	Número	%	Número	%		
Genes rápidos						
Ninguna (wt)	61	14.2	115	12.9	1.06	0.74-1.53
481T	0	0	0	0	-	-
803G	1	0.23	2	0.22	0.99	0.13-7.5
Genes lentos						
191A	0	0	1	0.11	-	-
282T	64	14.9	111	12.5	1.19	0.83-1.71
341C	92	21.5	155	17.5	1.29	0.93-1.81
481T	92	21.5	198	22.3	0.85	0.62-1.19
590A	62	14.5	110	12.4	1.16	0.80-1.66
803G	53	12.4	190	21.4	0.41	0.28-0.58
857A	2	0.46	3	0.33	1.32	0.26-6.73

En la Tabla 11 se puede observar el genotipo de todos los pacientes y controles estudiados. Hay que señalar que algunos de los genotipos encontrados en los controles (*NAT2*4/NAT2*14A*, *NAT2*4/NAT2*6B* y *NAT2*14A/NAT2*6A*) no fueron hallados en los pacientes. Se trata de genotipos muy poco frecuentes en nuestra población.

Tabla 11. Genotipo *NAT2* de todos los pacientes y controles.

Genotipo	Pacientes (DMNID) Número (%)	Controles sanos Número (%)	OR	95% IC
<i>NAT2*4/NAT2*4</i>	11 (10.1)	15 (7.0)	1.50	0.67-3.33
<i>NAT2*4/NAT2*14A</i>	0	1 (0.4)	-	-
<i>NAT2*4/NAT2*6B</i>	0	2 (0.9)	-	-
<i>NAT2*4/NAT2*12A</i>	1 (0.9)	2 (0.9)	0.99	0.13-7.56
<i>NAT2*4/NAT2*6A</i>	18 (16.5)	31 (14.4)	1.17	0.63-2.20
<i>NAT2*4/NAT2*5B</i>	20 (18.3)	49 (22.8)	0.76	0.43-1.35
<i>NAT2*14A/NAT2*6A</i>	0	1 (0.4)	-	-
<i>NAT2*6A/NAT2*6A</i>	5 (4.6)	8 (3.7)	1.24	0.41-3.73
<i>NAT2*6A/NAT2*5A</i>	3 (2.7)	0	-	-
<i>NAT2*6A/NAT2*5B</i>	31 (28.4)	60 (27.9)	1.03	0.62-1.70
<i>NAT2*5B/NAT2*7B</i>	2 (1.8)	3 (1.4)	1.32	0.26-6.81
<i>NAT2*5B/NAT2*5B</i>	18 (16.5)	43 (20.0)	0.79	0.43-1.44
TOTAL	109	215		

Contrariamente el genotipo *NAT2*6A/NAT2*5A* fue hallado en 3 pacientes (constituyendo un 2.7% de todos los genotipos hallados en pacientes) y en ningún control.

No hemos encontrado (Figura 8) ninguna diferencia en la frecuencia de variantes alélicas entre la población con DMNID y los controles sanos, utilizando un nivel de $p < 0.004$ (adecuado para un análisis multifactorial de 12 elementos, como es el caso). De hecho, el porcentaje de acetiladores rápidos (portadores al menos de uno de los genes de *NAT2* activos) es casi idéntico (45.8%, IC del 95% 35.7-54.3 y 46.5%, IC del 95% 38.1-51.3) en el grupo de pacientes con DMNID y el de los controles, respectivamente. Apreciamos además en la Figura 8 como 3 variantes alélicas (*NAT2*4*, *NAT2*6A* y

RESULTADOS

*NAT2*5B*) constituyen más del 90% del total, tanto de los pacientes como de los controles, sumando las variantes alélicas restantes menos de un 10%.

Además, si predecimos el fenotipo de acuerdo con el número de genes funcionales de cada individuo, no se observan tampoco diferencias entre el grupo de pacientes y los controles, tal y como puede apreciarse en la Figura 9.

Estos resultados indican que en el grupo estudiado el riesgo de desarrollar DMNID es independiente del genotipo *NAT2*.

Figura 8. Frecuencia +/- desviación estándar (DS) de variantes alélicas de NAT2 en pacientes y controles.

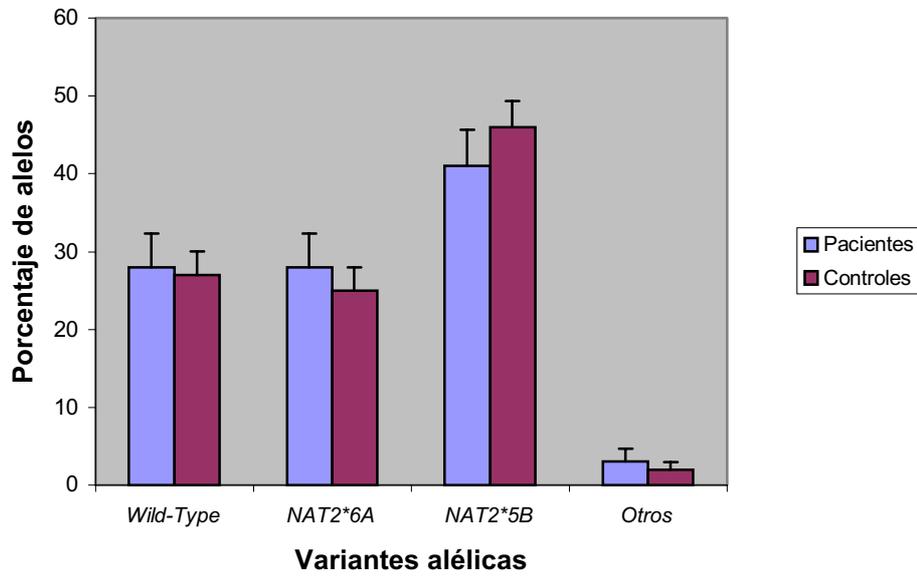
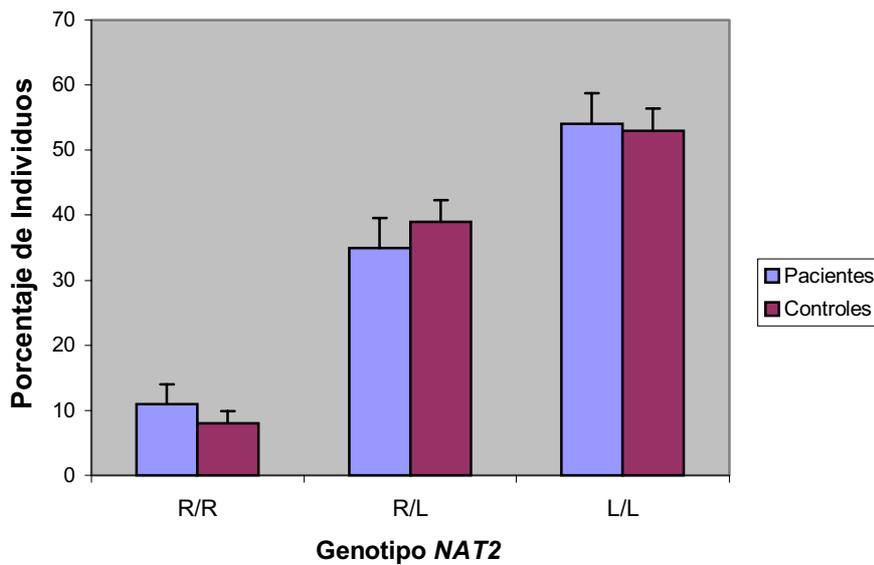


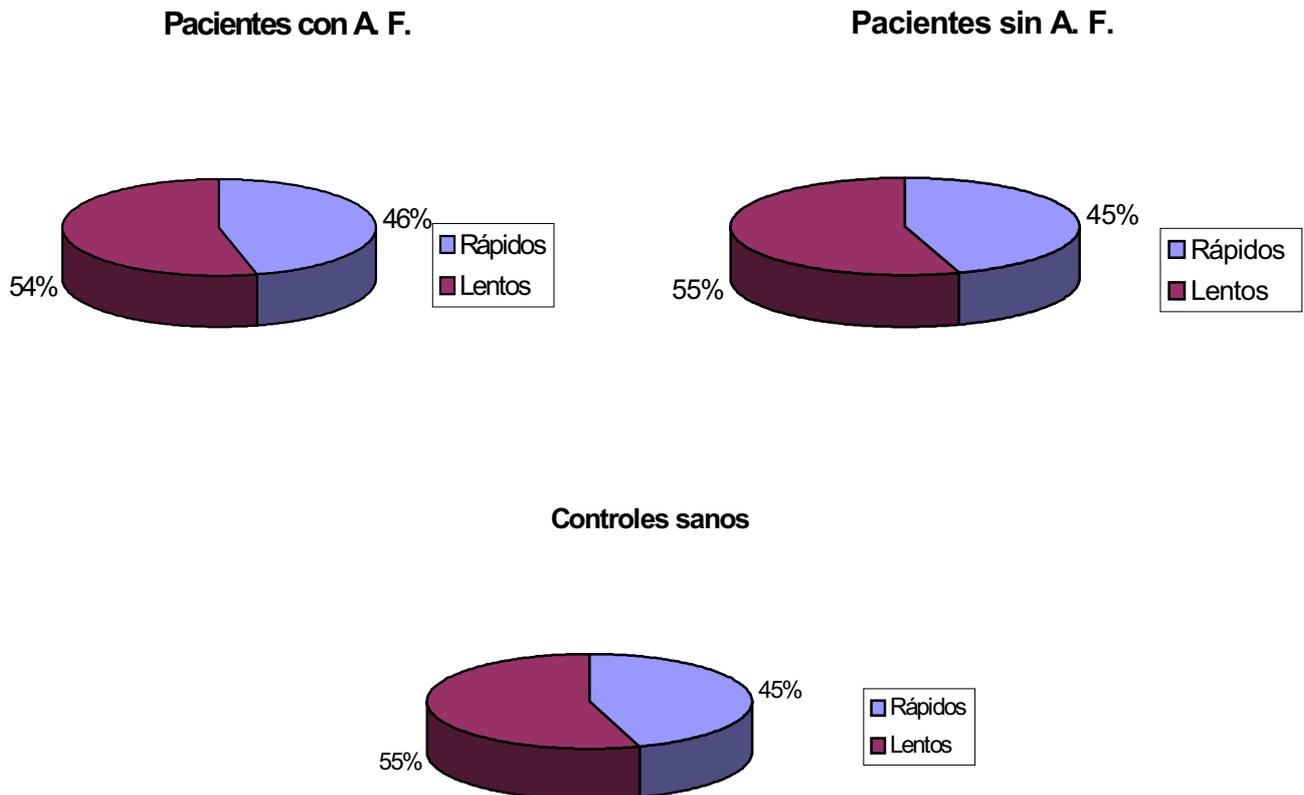
Figura 9. Frecuencia de genotipo +/- DS en pacientes y controles (R/R: rápidos/rápidos, R/L: rápidos/lentos, L/L: lentos/lentos).



RESULTADOS

Para comprobar si los antecedentes familiares de DMNID podrían influir para presentar un genotipo determinado dividimos a los pacientes en aquellos con (33 pacientes) y sin (76 pacientes) antecedentes familiares. Tampoco en este caso obtuvimos diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 10), de tal manera que el porcentaje de acetiladores rápidos fue del 45.6% y el 44.7% de los pacientes con antecedentes familiares y los que carecían de ellos, respectivamente.

Figura 10. Frecuencia de acetiladores rápidos en pacientes con y sin antecedentes familiares (A.F.) de diabetes y en los controles sanos.



CYP2D6

En el caso de CYP2D6 se estudiaron 111 pacientes y se compararon con 217 controles sanos. De este modo estudiamos 222 cromosomas de los pacientes con DMNID y 434 de los controles sanos. Estudiamos 7 variantes alélicas: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*9*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*1x2*, *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* y *CYP2D6*5*. Las 4 primeras se corresponden con genes activos y las 3 últimas con genes inactivos. El análisis de esas variantes alélicas reveló que 5 pacientes presentaban un genotipo metabolizador lento. En la Tabla 12 se puede observar el genotipo de todos los pacientes y controles estudiados.

Tabla 12. Genotipo *CYP2D6* de los pacientes y controles.

Genotipo	Pacientes (DMNID) Número (%)	Controles sanos Número (%)	OR	95% IC
<i>2D6*1/2D6*1</i>	73 (65.7)	138 (63.6)	1.10	0.68-1.77
<i>2D6*1/2D6*3</i>	4 (3.6)	5(2.3)	1.58	0.45-5.63
<i>2D6*1/2D6*4</i>	17 (15.3)	37 (17.0)	0.87	0.47-1.63
<i>2D6*1/2D6*9</i>	4(3.6)	8 (3.7)	0.98	0.30-3.13
<i>2D6*1/2D6*5</i>	2 (1.8)	5 (2.3)	0.78	0.17-3.53
<i>2D6*1/2D6*2</i>	0	1 (0.5)	-	-
<i>2D6*1/2D6*1x2</i>	5 (4.5)	14 (6.5)	0.68	0.25-1.88
<i>2D6*4/2D6*4</i>	4 (3.6)	6 (2.8)	1.31	0.39-4.47
<i>2D6*4/2D6*9</i>	0	1 (0.5)	-	-
<i>2D6*4/2D6*5</i>	1 (0.9)	2 (0.9)	0.98	0.13-7.49
<i>2D6*4/2D6*1x2</i>	1 (0.9)	0	-	-
Total	111	217		

Tampoco en este caso (al igual que en el polimorfismo acetilador) se encontró ninguna diferencia en las variantes alélicas entre un grupo y otro (Figura 11) ni en el fenotipo predicho a partir del genotipo entre ambos grupos (Figura 12).

Figura 11. Frecuencia +/- DS de variantes alélicas de *CYP2D6* en pacientes y controles. (M:Mutadas).

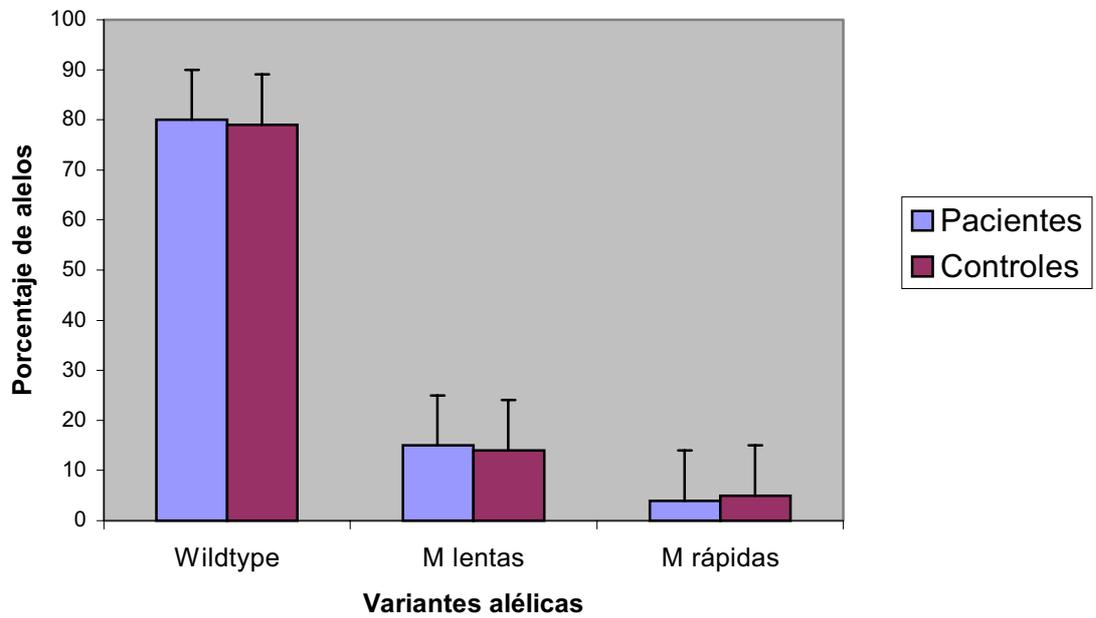
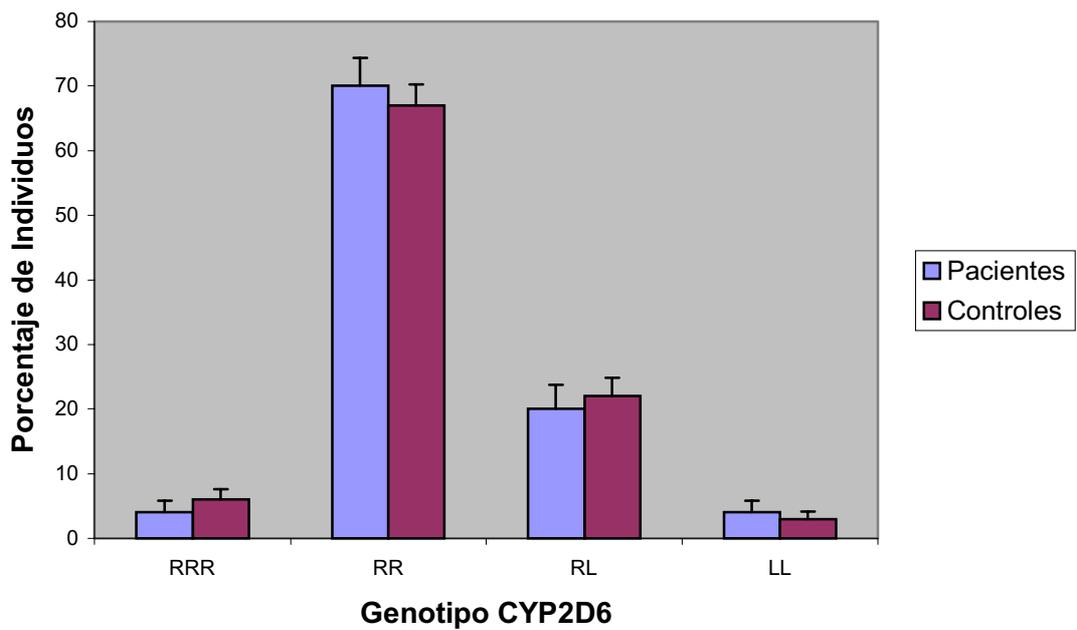


Figura 12. Frecuencia de genotipo de hidroxilación +/- DS en pacientes y controles (R:rápidos, L:lentos).



RESULTADOS

Estos resultados confirman un estudio previo realizado a nivel de fenotipo el cual sugiere una falta de asociación entre el polimorfismo CYP2D6 y la DMNID (Kallio y cols., 1990).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran claramente la ausencia de diferencias a nivel de genotipo en la capacidad acetiladora entre la población sana española y la población de diabéticos tipo II. El porcentaje de mutaciones en el gen *NAT2* no difiere significativamente entre una y otra población y las principales mutaciones aparecen con una frecuencia similar en ambos grupos.

Los resultados obtenidos relativos al polimorfismo *NAT2* en nuestro estudio son contrarios a la mayoría de los estudios realizados previamente a nivel de fenotipo en los cuales se encontraba un exceso de acetiladores rápidos en los sujetos diabéticos, tanto en los diabéticos tipo II como en los diabéticos tipo I (Tabla 13 y 14). De todas maneras hay que resaltar que existen estudios de fenotipo en los que no apareció esa asociación (Ladero y cols., 1982) y en otros incluso se obtuvieron resultados contrarios, apreciándose un exceso de acetiladores lentos en los diabéticos tipo I (Evans y cols., 1985).

Hasta hace algunos años, antes de que se aclarasen las bases genéticas del polimorfismo acetilador, tan solo se podían realizar estudios a nivel de fenotipo. Debido a ello los resultados obtenidos podían estar enmascarados por factores como los propios cambios producidos por el estado patológico y por las diversas terapias aplicadas para combatirlos, e incluso por la posibilidad de que el fenotipo fuese ligado a la causa de la enfermedad. Algunos estudios de fenotipo han sido confirmados con otros a nivel de genotipo como la asociación de *CYP2D6* con cáncer de hígado y pulmón (Hirnoven y cols., 1993; Agúndez y cols., 1994b y 1995d), pero muchos otros no lo han sido.

Tabla 13. Relación entre diabetes mellitus tipo I y fenotipo acetilador rápido (Odds ratio e intervalo de confianza).

	OR	95% I.C.
Bodansky y cols., 1981	1.54	0.89-2.63
Bonisolli y cols., 1985	2.27	1.14-4.54
Ladero y cols., 1982	1.19	0.55-2.50
Mattila y Tiitinen, 1967	7.58	
McLaren y cols., 1977	1.82	1.03-3.22
Shenfield y cols., 1982	12.19	1.49-6.66
Stryjek-Kaminska y cols., 1988	2.24	1.23-4.16

Tabla 14. Relación entre diabetes mellitus tipo II y fenotipo acetilador rápido (Odds ratio e intervalo de confianza).

	OR	95% I.C.
Nuestro estudio	0.97	0.61-1.54
Bonisolli y cols.,1985	1.47	0.33-0.75
Burrows y cols., 1978	2.39	1.31-4.34
Ladero y cols.,1982	0.99	0.58-1.69
Mattila y Tiitinen, 1967	0.99	0.33-2.94
McLaren y cols.,1977	1.59	1.02-2.50
Shenfield y cols.,1982	1.67	0.90-3.03
Stryjek-Kaminska y col 1988	1.72	0.95-3.12

Hay múltiples factores que pueden explicar la diferencia entre nuestros resultados y la mayoría de los obtenidos a nivel de fenotipo. Todos ellos se basan en la hipótesis de que el exceso de acetiladores rápidos no esté relacionado con la etiología de la enfermedad, sino que sea un efecto de la misma. Es decir, que la propia enfermedad, alguna de sus complicaciones o

el tratamiento de las mismas pueda variar el status acetilador, sin que esta variación tenga un origen genético. Se ha demostrado que la hiperglucemia acelera la capacidad acetiladora (Thom y cols., 1981; Shenfield y cols., 1982; Suhardjono y cols., 1986; Lindsay y Baty 1990; Lindsay y Bair 1991). El mecanismo propuesto para ello es que la hiperglucemia aumenta la concentración hepática de Acetil-CoA que es un cofactor fundamental para la actividad *N*-acetiltransferasa, como se comenta en el capítulo de Introducción (Figura 1). Thom y cols. demostraron en 1981 que la vida media de isoniazida disminuyó en 8 sujetos sanos al administrarles 100 gr de glucosa oral. Esta inducción bioquímica parece que ocurre después de horas, más que de días o de meses, puesto que el nivel de hemoglobina glicosilada, que refleja las concentraciones medias de glucosa del mes previo, no se encuentra relacionado con la capacidad acetiladora (Bodansky y cols., 1981; Shenfield y cols., 1982). Suhardjono y cols. en 1986 estudiaron el status acetilador de 49 voluntarios sanos (47 hombres y 2 mujeres) mediante la sulfadiazina y observaron que una sobrecarga de glucosa aumentaba la capacidad acetiladora, aunque no en tal grado que llegará a convertir a los acetiladores lentos en rápidos. Este dato es esperable, ya que individuos homocigotos para alelos *NAT2* defectuosos presentan actividades del orden del 10% de las que presentan los individuos homocigotos para genes activos. Sin embargo, este factor sí que podría ser responsable de un “desplazamiento” de los individuos heterocigotos, desde actividades borderline, que en determinados casos podrían ser clasificados como acetiladores lentos, hacia actividades claramente clasificables como correspondientes a individuos acetiladores rápidos. Algo similar ocurre con el etanol, el cual aumenta también la disponibilidad hepática de Acetil-CoA. Olsen y cols. demostraron en 1978 que el etanol aumentaba la acetilación de sulfadiazina, tanto en acetiladores rápidos como en los lentos. Realizaron un estudio con 16 voluntarios sanos y observaron que tras conseguir una concentración sérica de 1g/l de etanol la vida media de sulfadiazina disminuyó un 20% tanto en los acetiladores

rápidos como en los lentos y aumentó la cantidad de fármaco acetilado tanto en sangre como en orina. En 3 acetiladores lentos el incremento fue tan marcado que de no haber tenido en cuenta la administración del etanol éstos hubiesen sido clasificados erróneamente como acetiladores rápidos. También comprobaron como al administrar etanol a ratas hasta conseguir una concentración de 2 g/l las células hepáticas de esas ratas mostraron un incremento de un 30% en la capacidad de acetilar la sulfadiazina. Además, tanto los antidiabéticos orales (sobre todo la glibenclamida) como la insulina también aceleran el metabolismo acetilador (Stroev y Belkina, 1989). Estos autores observaron dicho efecto en animales sanos.

Caso de existir diferencias entre los pacientes con DMNID y el resto de la población a nivel de fenotipo acetilador (lo cual no parece ocurrir en la población española según Ladero y cols. en 1982), estas podrían deberse a cualquiera de los factores mencionados anteriormente o a una suma de varios de ellos que pueden actuar influyendo sobre el fenotipo y “falseando” de alguna manera los resultados de éste.

Nuestros resultados, por el contrario, sí que coinciden con Mrozikiewicz y cols. y Neugebauer y cols. El primero de ellos genotipó en Polonia a 165 niños con DMID, comparándolos con 107 niños utilizados como control. Se observó un 40.6% y un 36.6% de acetiladores rápidos en dichos grupos respectivamente, siendo esta pequeña diferencia estadísticamente no significativa y concluyéndose que el genotipo acetilador rápido no es un factor de riesgo heredable para el desarrollo de DMID. En este estudio a diferencia del nuestro tan solo se analizaron 3 mutaciones (aquellas situadas en las posiciones 857, en la 590 y en la 341). En 66 pacientes y en 54 de los controles se procedió a una fenotipación simultánea observándose tan solo 5 casos discrepantes. Se estableció de esta manera que la correlación entre el genotipo y el fenotipo era de alrededor del 95%.

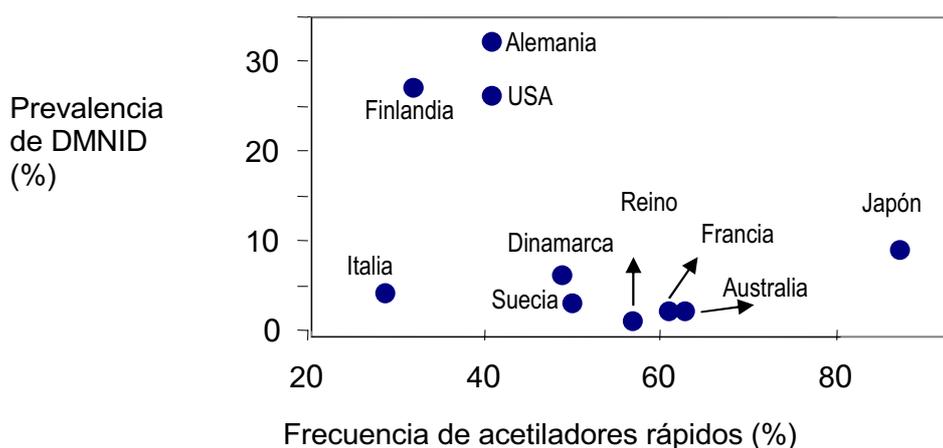
Neugebauer genotipó a un grupo de japoneses diabéticos tipo II (compuesto por 43 sujetos con nefropatía diabética, 24 con microalbuminuria

y 18 con normoalbuminuria) y a un grupo de sujetos no diabéticos (62 sujetos con enfermedad renal y 51 sujetos sanos). Los individuos diabéticos con un genotipo acetilador lento fueron los siguientes: un 7.0% de los que sufrían nefropatía, un 20.8% de los que tenían microalbuminuria y un 0% de los sujetos con normoalbuminuria. El total de los diabéticos con un genotipo acetilador lento fue de un 9.4%. Entre aquellos no diabéticos con enfermedad renal y entre los sanos hubo un 6.5% y un 7.8% de lentos respectivamente. Las diferencias no fueron significativas, concluyendo que el polimorfismo acetilador no constituye un marcador genético de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética en japoneses con diabetes mellitus tipo II. Este estudio al igual que el realizado por Mrozikiewicz tan solo analizó las mutaciones situadas en las posiciones 341, 590 y 857. Sus resultados fueron concordantes con los estudios genéticos de *NAT2* realizados previamente en la población japonesa (Deguchi y cols., 1990).

Puesto que en la etiología de la DMNID existen factores genéticos implicados (Green, 1990) parecía interesante relacionar el polimorfismo genético *NAT2* con el desarrollo de DMNID. De hecho, de acuerdo con el resultado de la mayoría de los estudios de fenotipo se especuló con la posibilidad de los acetiladores rápidos fuesen más susceptibles de sufrir DMNID, aunque nunca se encontró una hipótesis biológica adecuada que justificase dicha asociación. Si esta asociación fuese correcta cabría esperar que aquellas poblaciones con alto porcentaje de sujetos con DMNID, como por ejemplo los Finlandeses, donde la prevalencia de la DMNID es de un 25-30% (Haavisto y cols., 1983), tuviesen un mayor porcentaje de acetiladores rápidos que otras poblaciones europeas. Sin embargo, en ellos la frecuencia de acetiladores rápidos es similar a la de otras poblaciones europeas en las cuales la prevalencia de la DMNID es muy inferior como por ejemplo ocurre en los británicos (Forrest y cols., 1986) o en los italianos (Morsiani y cols., 1985).

Podría especularse que los resultados de nuestro estudio están influenciados por la diferente edad presentada por los pacientes y los controles. Sin embargo, está ampliamente aceptado que la distribución de los diferentes alelos de *NAT2* no se ve afectada por la edad (Agúndez y cols., 1997c). Es indudable que alguno de los sujetos incluidos como controles desarrollarán en el futuro DMNID. Sin embargo, dado que la prevalencia de la DMNID en los países del sur de Europa es de alrededor del 1-5% (Pozza y cols., 1993), el hecho de que algunos de los controles desarrollen en el futuro DMNID no modifica sustancialmente los resultados obtenidos.

Figura 13. Correlación entre la prevalencia de DMNID y la frecuencia de acetiladores rápidos en distintos países.



De este modo, nuestros resultados muestran claramente que en la población española no hay ninguna relación entre el genotipo *NAT2* y la DMNID y no confirman la mayoría de los hallazgos previos que establecían una relación en los estudios de fenotipo entre los acetiladores rápidos y la diabetes mellitus insulín y no-insulín-dependiente. Nuestros resultados, por el contrario vienen a coincidir con la falta de relación entre la diabetes mellitus y el fenotipo acetilador observada en 1982 por Ladero y cols. No es la diabetes la única patología en la cual los hallazgos previos a nivel de fenotipo no están siendo verificados por estudios de genotipo. En el cáncer de colón la mayoría

de los estudios a nivel de fenotipo encontraban una asociación con el fenotipo acetilador rápido (Lang y cols., 1986; Hett y cols., 1987) que se trataba justificar mediante la posible activación de procarcinógenos en la mucosa intestinal mediante acetilación. Sin embargo, algún estudio de genotipo posterior no confirmó dicha relación (Kirling y cols., 1991), al menos tomando a todos los pacientes con cáncer de colón como un grupo único. Sin embargo, recientemente nuestro grupo ha confirmado dicha asociación para un subgrupo de pacientes (Agúndez y cols., 2000).

Hasta el momento actual la relación entre el polimorfismo NAT2 y diversas patologías solo ha podido ser demostrada convincentemente a nivel de fenotipo y posteriormente de genotipo con el cáncer de vejiga. Se ha demostrado que los acetiladores lentos son más propensos a sufrirlo (Marcus y cols., 2000).

Con relación al polimorfismo CYP2D6 nuestros resultados muestran que no hay ninguna diferencia significativa en el genotipo de *CYP2D6* entre la población general española y los pacientes con DMNID. Tan solo 5 de los 111 pacientes con DMNID genotipados presentaron un genotipo lento, con lo cual el porcentaje de lentos no difiere significativamente del de la población general. Estos resultados impiden establecer cualquier tipo de nexo genético entre la DMNID y el polimorfismo de CYP2D6.

La posible relación entre la DMNID y el polimorfismo CYP2D6 ya fue estudiada en 1990 por Kallio y cols. a nivel de fenotipo. Después de fenotipar 42 pacientes con DMNID llegaron a la conclusión que no había diferencias significativas entre la población general y los pacientes con DMNID en lo que respecta al fenotipo de debrisoquina. Nuestros resultados vienen a confirmar a nivel genético los obtenidos por Kallio y cols. a nivel de fenotipo. Este autor en su estudio también analizó pacientes con DMID obteniendo resultados similares a los obtenidos con los pacientes con DMNID, es decir, que no había asociación entre el fenotipo de debrisoquina y la DMID. Desde ese trabajo hasta el nuestro no han existido estudios intentando relacionar el

polimorfismo CYP2D6 y la diabetes mellitus. En este sentido, esta escasez de trabajos contrasta con la gran cantidad de trabajos realizados para intentar relacionar el polimorfismo acetilador con la diabetes mellitus. Sin embargo, hay que señalar que muy recientemente se ha publicado un trabajo con resultados similares a los obtenidos por nuestro grupo (Hegele y cols., 2000). Los autores de dicho trabajo no encuentran diferencias en el polimorfismo CYP2D6 entre los individuos diabéticos y aquellos que no lo son.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las frecuencias de genotipos, alelos mutados y fenotipos inferidos de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 correspondientes al polimorfismo *NAT2* no presentan diferencias estadísticamente significativas al compararse con las de los controles sanos.
2. Las frecuencias de genotipos, alelos mutados y fenotipos inferidos de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 correspondientes al polimorfismo *CYP2D6* no presentan diferencias estadísticamente significativas al compararse con las de los controles sanos.
3. Los resultados obtenidos en esta Tesis no avalan ninguna asociación causa-efecto entre los polimorfismos genéticos estudiados y la diabetes mellitus tipo 2.
4. Los resultados de otros estudios en los que el fenotipo acetilador rápido parecía estar asociado a la diabetes tipo 2 podrían ser debidos a la propia diabetes y/o a los fármacos administrados.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

-Abe M, Deguchi T, Suzuki T. The structure and characteristics of a fourth allele of polymorphic *N*-acetyltransferase gene found in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993;**191**: 811-816.

-Agúndez JA, Martínez C, Ledesma MC, Ladona MG, Ladero JM, Benítez J. Genetic basis for differences in debrisoquin polymorphism between a Spanish and other white populations. *Clin Pharmacol Ther*, 1994a;**55**: 412-417.

-Agúndez JA, Martínez C, Ladero JM, Ledesma MC, Ramos JM, Marín R, Rodríguez A, Jara C, Benítez J. Debrisoquin oxidation genotype and susceptibility to lung cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 1994b;**55**: 10-14.

-Agúndez JA, Carrillo JA, Martínez C, Benítez J. Aminopyrine metabolism in man: the acetylation of aminoantipyrine cosegregates with acetylation of caffeine. *Ther Drug Monit*, 1995a;**17**: 1-5.

-Agúndez JAG, Ladero JM, Olivera M, Albidúa R, Román JM, Benítez J. Genetic analysis of the arylamine *N*-acetyltransferase polymorphism in breast cancer patients. *Oncology*, 1995b;**52**: 7-11.

-Agúndez JAG, 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*, 1995c;**57**: 265-269.

-Agúndez JAG, Ledesma MC, Benítez J, Ladero JM, Rodríguez-Lescure A, Díaz-Rubio M. *CYP2D6* genes and risk of liver cancer. *Lancet*, 1995d;**345**: 830-831.

-Agúndez JA, Arroyo R, Ledesma MC, Martínez C, Ladero JM, de Andres C, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Álvarez-Cermeno JC, Varela de Seijas E, Giménez

REFERENCIAS

Roldan S, Benítez J. Frequency of *CYP2D6* allelic variants in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 1995e;**92**: 464-467.

-Agúndez JAG, Olivera M, Martínez C, Ladero JM, Benítez J. Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human *NAT2* gene in a white population. *Pharmacogenetics*, 1996a;**6**: 423-428.

-Agúndez JA, Olivera M, Ladero JM, Rodríguez-Lescure A, Ledesma MC, Díaz-Rubio M, Meyer UA, Benítez J. Increased risk for hepatocellular carcinoma in *NAT2*-slow acetylators and *CYP2D6*-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics*, 1996b;**6**: 501-512.

-Agúndez JAG, Ramírez R, Hernández M, Llera A, Benítez J. Molecular heterogeneity at the *CYP2D* locus in Nicaraguans: impact of gene-flow from Europe. *Pharmacogenetics*, 1997a;**7**: 337-340.

-Agúndez JA, Jiménez-Jiménez FJ, Tejeda R, Ledesma MC, Orti-Pareja M, Gasalla T, Molina JA, Ruíz J, Coria F, Duarte J, Vázquez A, Ladero JM, Benítez J. *CYP2D6* polymorphism is not associated with essential tremor. *Eur Neurol*, 1997b;**38**: 99-104.

-Agúndez JA, Rodríguez I, Olivera M, Ladero JM, García MA, Ribera JM, Benítez J. *CYP2D6*, *NAT2*, and *CYP2E1* genetic polymorphisms in nonagenarians. *Age Ageing*, 1997c;**26**: 147-151.

-Agúndez JA, Jiménez-Jiménez FJ, Luengo A, Molina JA, Orti-Pareja M, Vázquez A, Ramos F, Duarte J, Coria F, Ladero JM, Álvarez-Cermeno JC, Benítez J. Slow allotypic variants of the *NAT2* gene and susceptibility to early-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1998;**51**: 1587-1592.

-Agúndez JAG, Lozano M, Ladero JM, Sastre J, Cerdán FJ, Díaz-Rubio M, Benítez J. *N*-acetyltransferase 2 (*NAT2*) genotype and colorectal carcinoma: Risk variability according to tumour site?. *Scand J Gastroenterol*, 2000;**10**: 1087-1091.

REFERENCIAS

- 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**: 441-446.
- Alvan G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphism of debrisoquine and mephenytoin in European population. *Eur J Pharmacol*, 1990;**39**: 533-537.
- Andrés HH, Vogel RS, Tarr GE, Johnson L, Weber WW. Purification, physicochemical and kinetic properties of liver acetyl-CoA:arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylators rabbits. *Mol Pharmacol*, 1987;**31**: 446-456.
- Armstrong M, Fair Brother K, Idle JR, Daly AK. The cytochrome P450 CYP2D6 allelic variant CYP2D6J and related polymorphism in a European population. *Pharmacogenetics*, 1994;**4**: 73-81.
- Atkinson A, Singelton AB, Steward A, Ince PG, Perry RH, Mckeith IG, Fairbairn AF, Edwardson JA, Daly AK, Morris CM. CYP2D6 is associated with Parkinson's disease but not with dementia with Lewy Bodies or Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics*, 1999;**9**: 31-5.
- Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW. Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*, 1993;**14**: 1689-1692.
- Benítez J, Ladero JM, Fernández-Gundin MJ, Llerena A, Cobaleda J, Martínez C, Muñoz JJ, Vargas E, Prados J, González-Rozas F, Rodríguez-Molina J, Usón AC. Polymorphic oxidation of debrisoquine in bladder cancer. *Ann Med*, 1990a;**22**: 157-160.

REFERENCIAS

- Benítez J, Ladero JM, Jiménez-Jiménez FJ, Martínez C, Puerto AM, Valdivielso MJ, Llerena A, Cobaleda J, Muñoz JJ. Oxidative polymorphism of debrisoquine in Parkinson`s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1990b;**53**: 289-92.
- Benítez J, Ladero JM, Jara C, Carrillo JA, Cobaleda J, Llerena A, Vargas E, Muñoz JJ. Polymorphic oxidation of debrisoquine in lung cancer patients. *Eur J Cancer*, 1991;**27**: 158-161.
- Benítez J, Barquero MS, Coria F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Ladero JM. Oxidative polymorphism of debrisoquine is not related to the risk of Alzheimer`s disease. *J Neurol Sci*, 1993;**117**: 8-11.
- Bertilsson L, Lou Y-Q, Du Y-L, Liu Y, Kuang T-Y, Lia X-M, Wang K-Y, Reviriego J, Iselius L, Sjöqvist F. Pronounced differences between native Chinese and Swedish population in the polymorphic hydroxylation of debrisoquine and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther*, 1992;**51**: 388-397.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA. Human arylamine *N*-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol*, 1990;**9**: 193-203.
- Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim H, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**: 5237-5241.
- Bodansky HJ, Druy PL, Cudworth AG, Evans DAP. Acetylator phenotypes and type I (insulin-dependent) diabetics with microvascular disease. *Diabetes*, 1981;**30**: 907-910.
- Bönicke R, Reif W. Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in humans and animals. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, 1953;**220**: 321-333.

REFERENCIAS

- Bonisolli L, Pontiroli A, De Pasqua A, Calderara A, Maffi P, Gallus G, Radaelli G, Pozza G. Association between chlorpropamide-alcohol flushig and fast acetylator phenotype in type I and type II diabetes. *Acta Diabet Latina*, 1985;**22**: 305-315.
- Bouchardy C, Benhamou S, Dayer P. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res*, 1996;**56**: 251-253.
- Brockton N, Little J, Sharp I, Cotton SC. *N*-acetyltransferase polymorphism and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2000;**151**: 846-861.
- Broly F, Marez D, Lo Guidice JM, Sabbagh N, Legrand M, Boone P, Meyer UA. A nonsense mutation in the cytochrome P450 CYP2D6 gene identified in a Caucasian with an enzyme deficiency. *Hum Genet*, 1995;**96**: 601-603.
- Bulovskaya LN, Krupkin RG, Bochina TA, Shipova AA, Pavlova MV. Acetylator phenotype in patients with breast cancer. *Oncology*, 1978;**35**: 185-188.
- Bulpitt CJ. Confidence intervals. *Lancet*, 1987;**1**: 494-497.
- Burrow AW, Hockaday TDR, Mann JI, Taylor JG. Diabetic dimorphism according to acetylator status. *Br Med J*, 1978;**1**: 208-210.
- Caporaso N, Tucker MA, Hoover RN, Hayes RB, Pickle LW, Issaq HJ, Muschik GM. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. *J Natl Cancer Inst*, 1990;**82**: 1264-1272.
- Cartwright RA, Glasham RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Khan MA. Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, 1982;**2**: 842-846.

REFERENCIAS

- Cartwright RA, Adib R, Appelyard I, Glashan RW, Gray B, Hamilton-Stewart PA, Robinson M, Barham-Hall D. Cigarette smoking and bladder cancer: an epidemiological inquiry in West Yorkshire. *J Epidemiol Community Health*, 1983;**37**: 256-263.
- Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Roots I. Arylamine *N*-acetyltransferase (*NAT2*) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasians individuals: Correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet*, 1995;**57**: 581-592.
- Coombes RC, Foster AB, Harland SJ, Jarman M, Nice EC. Polymorphically acetylated aminoglutethimide in humans. *Br J Cancer*, 1982;**46**: 340-345.
- Chekharina YA, Bulovskaya LN, Pavlova MV, Krupkin RG. Activity of *N*-acetyltransferase in patients with malignant lymphomas. *Neoplasma*, 1978;**25**: 471-475.
- Daly AK, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM. Characterization and PCR- based deletion of two different hybrid *CYP2D7P/CYP2D6* alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1996;**6**: 319-328.
- Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem*, 1990;**265**: 12757-60.
- Deguchi T. Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase of human liver. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 18140-18147.
- Dhaini HR, Levy GN. Arylamine *N*-acetyltransferase (*NAT1*) genotypes in a Lebanese population. *Pharmacogenetics*, 2000;**10**: 79-83.
- Drozd M, Gierek T, Jendryczko A, Pilch J, Berskarska J. *N*-acetyltransferase of patients with cancer of larynx. *Neoplasia*, 1987;**34**: 481-484.

REFERENCIAS

- Dupret JM, Grant DM. Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase expressed in *E. Coli*: evidence for direct involvement of cys 68 in the catalytic mechanism of polymorphic human NAT2. *J Biol Chem*, 1992;**267**: 7381-7385.
- Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osikowska-Evers BO, Teives G, Zekom C, Rittner C. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol*, 1987;**23**: 455-456.
- Evans DAP, Manley KA, McKusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J*, 1960;**2**: 485-491.
- Evans DAP. Pharmacogenetique. *Med Hyg (Geneve)*, 1962;**20**: 905-908.
- Evans DA, White TA. Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med*, 1964;**63**: 394-403.
- Evans DAP, Eze LC, Whibley EJ. The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer. *J Med Genet*, 1983;**20**: 330-333.
- Evans DAP, Patterson S, Francisco P, Alvarez G. The acetylator phenotypes of Saudi Arabian diabetics. *J Med Genet*, 1985;**22**: 479-483.
- Evans DAP. *N*-Acetyltransferase. *Pharmacol Ther*, 1989;**42**: 157-234.
- Evans DAP. *N*-acetyltransferase. En : Kalow W, ed. Pharmacogenetics of drug metabolism. New York: Pergamon Press, 1992: 95-178.
- Evert B, Griese E-U, Eichelbaum MA. A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine to proline exchange is associated with the poor

REFERENCIAS

metabolizer phenotype of sparteine. *Naumyn-Schmiederg's Arch Pharmacol*, 1994;**350**: 434-439.

-Forrest RD, Jackson CA, Yudkins JS. Glucose intolerance and hypertension in North London: the Islington diabetes survey. *Diabetic Med*, 1986;**3**: 338-342.

-Gaedigk A, Martin B, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer U. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1991;**48**: 943-950.

-Gawronska-Sklarz B, Gornik W, Pawlik A, Kunicki P, Wojcicki J, Sitkiewicz D, Sych Z. N-acetylation and hydroxylation polymorphism in type II diabetics with microvascular disturbances. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997;**51**: 431-5.

-González FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA. Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*, 1988;**2**: 174-179.

-González FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*, 1992;**13**: 346-352.

-Gough AC, Miles JS, Spurr MK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*, 1990;**347**: 773-776.

-Gough AC, Dale Smith CA, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK. Localization of CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics*, 1992;**15**: 430-432.

REFERENCIAS

-Grant DM, Tang BK, Kalow W. A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol*, 1984;**17**: 459-464.

-Grant DM, Mörike K, Eichelbaum M, Meyer UA. Acetylation pharmacogenetics. The slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. *J Clin Invest*, 1990;**85**: 968-972.

-Gren A. The role of genetic factors in the development of insulin-dependent diabetes mellitus. En: Baekkeskov S, Hansen B, eds. *Currents topics in microbiology and immunology. Human diabetes: genetic, environmental and autoimmune etiology*. Berlin: Springer Verlag, 1990: 3-16.

-Haavisto M, Mattila K, Rajala S. Blood glucose and diabetes mellitus in subjects aged 85 years or more. *Acta Med Scand*, 1983; **214**: 239-244.

-Hamilton RA, Kowalsky SF, Wright EM, Cernak P, Benzinger DP, Stroshane RM, Edelson J. Effect of the acetylator phenotype on amrinone pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol Ther*, 1986;**40**: 615-619.

-Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, González FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934 to A base change in intron 3 to a mutant *CYP2D6* allele results in aberrant 3'-splice recognition site. *Am J Hum Genet*, 1990;**47**: 994-1001.

-Hegele RA, Kwan K, Harris SB, Hanley AJ, Zinman B, Cao H. NAT2 polymorphism associated with plasma glucose concentration in Canadian Oji-Cree. *Pharmacogenetics*, 2000;**10**: 233-238.

-Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: *CYP2D6*. *Genomics*, 1992;**14**: 49-58.

REFERENCIAS

-Hein DW, Weber WW. Polymorphic *N*-acetylation of phenelzine and monoacetylhydrazine by highly purified rabbit liver isoniazid *N*-acetyltransferase. *Drug Metab Dispos*, 1982;**10**: 225-229.

-Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis*, 1993;**14**: 1633-1618.

-Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD, Gray K. Molecular genetics of human polymorphic *N*-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type, mutant and chimeric *NAT2* aloczymes. *Hum Mol Genet*, 1994;**3**: 729-734.

-Henning S, Cascorbi I, Munchow B, Jahnke V, Roots I. Association of arylamine *N*-acetyltransferase (*NAT2*) genotype and susceptibility of sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics*, 1999;**9**: 103-111.

-Hett KF, David BM, Detchon P, Kastleden WM, Kwa R. Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res*, 1987;**47**: 1466-9.

-Hirnoven A, Husgafvel-Pursianen K, Anttila S, Karjalainen A, Pelkonen O, Vainio H. PCR-based *CYP2D6* genotyping for finish lung cancer patients. *Pharmacogenetics*, 1993;**3**: 19-27.

-Hughes HB, Schmidt LH, Biehl JP. The metabolism of isoniazid, its implications in therapeutic use. *Trans 14th Conf. Chemother. Tuberc.*, 1955;217-222. Washington, DC:US Veterans Adm Army Navy.

-Inatomi H, Katoh T, Kawamoto T, Matsumoto T. *NAT2* gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to bladder cancer in Japanese. *Int J Urol*, 1999;**6**: 446-54.

REFERENCIAS

- Jenne JW. Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation of *p*-aminosalicylic acid. *J Clin. Invest*, 1965; **44**: 1992-2002.
- Jiménez-Nieto LC, Ladero JM, Fernández-Gundín MJ, Robledo A. Acetylator phenotype in psoriasis. *Dermatológica*, 1989; **178**: 136-7.
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl M-L, Sjöqvist F, Ingelman-Sunderg M. Inherited amplification for an active gene in the cytochrome P450 CYP2D6 locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 11825-11829.
- Johansson I, Oscarson M, Yue Q-Y, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sunderg M. Genetics analysis of the chinese cytochrome P4502D locus: Characterization of variant *CYP2D6* genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*, 1994; **46**: 452-459.
- Joost O, Taylor A, Thomas CA, Cuppler LA, Saint-Hilaire MH, Feldman RG, Baldwin CT, Myers RH. Absence of effect of seven functional mutations in the CYP2D6 gene in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 1999; **14**: 590-5.
- Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer U. Multiple mutations of the human cytochrome *P450IID6* gene (*CYP2D6*) in poor metabolizer of debrisoquine. *J Biol Chem*, 1990; **265**: 17209-17214.
- Kallio J, Huupponen R, Viikari J. Debrisoquine hydroxylation polymorphism in diabetic patients. *Diabetes Res*, 1990; **15**: 125-129.
- Karim AKMB, Evans DAP. Polymorphic acetylation of nitrazepam. *J Med Genet*, 1976; **13**: 17-19.

REFERENCIAS

- Karlsson E, Aberg G, Collste P, Molin L, Norlander B, Sjoqvist F. Acetylation of procainamide in man. A preliminary communication. *Eur J Clin Pharmacol*, 1975;**8**: 79-81.
- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, González F. 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.
- Kingston M, Skoog WC. Diabetes in Saudi Arabia. *Saudi Med*, 1986;**7**: 130-142.
- Kirling WG, Ogolla F, Andrews AF, Trinidad A, Ferguson RJ, Yerokun T, Mpezo M, Hein DW. Acetylator genotype-dependent expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human colon cytosol from non-cancer and colorectal cancer patients. *Cancer Res*, 1991;**51**: 549-555.
- Ladero JM, Romero AA, García G. Acetilación hepática en la población española. *Gastroenterol Hepatol*, 1979;**2**: 236-240.
- Ladero JM, Arrojo, De Salamanca RE, Gómez M, Cano F, Alfonso M. Hepatic acetylator phenotype in diabetes mellitus. *Ann Clin Res*, 1982;**14**: 187-189.
- Ladero JM, Kwok CK, Jara C, Fernández L, Silmi AM, Tapia D, Uson AC. Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients. *Ann Clin Res*, 1985;**17**: 96-99.
- Ladero JM, Fernández MJ, Palmeiro R, Muñoz JJ, Jara C, Lázaro C, Pérez-Manga G. Hepatic acetylation polymorphism in breast cancer patients. *Oncology*, 1987a;**44**: 341-344.
- Ladero JM, Fernández MJ, Palmeiro R. Acetilación hepática polimorfa en la mastopatía fibroquística. *Rev Clin Esp*, 1987b;**181**: 24-25.

REFERENCIAS

- Ladero JM, Jiménez LC, Fernández MJ, Robledo A. Acetylator polymorphism in discoid lupus erythematosus. *Eur J Clin Pharmacol*, 1988;**34**: 307-308.
- Ladero JM, Jiménez FJ, Benítez J, Fernández-Gundín MJ, Martínez C, Llerena A, Cobaleda J, Muñoz JJ. Acetylator polymorphism in Parkinson's disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989;**37**: 391-393.
- Ladero JM, González JF, Benítez J, Vargas E, Fernández MJ, Baki W, Díaz- Rubio M. Acetylator polymorphism in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*, 1991a;**51**: 2098-2100.
- Ladero JM, Benítez J, Jara C, Llerena A, Valdivielso MJ, Muñoz JJ, Vargas E. Polymorphic oxidation of debrisoquine in woman with breast cancer. *Oncology*, 1991b;**48**: 107-110.
- Ladero JM, Benítez J, González FJ, Vargas E, Díaz-Rubio M. Oxidative polymorphism of debrisoquine is not related to human colorectal cancer. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991c;**40**: 525-527.
- Ladero JM, Barquero MS, Coria F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Benítez J. Acetylator polymorphism in Alzheimer's disease. *Eur J Med*, 1993a;**2**: 281-283.
- Ladero JM, Andres MP, Banares A, Fernández B, Hernández C, Benítez J. Acetylator polymorphism in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993b;**45**: 279-281.
- Ladero JM, Arroyo R, De Andres C, Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Varela de Seijas E, Giménez-Roldan F, Benítez J. Acetylator polymorphism in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 1994;**89**: 102-104.

REFERENCIAS

-Ladero JM, Benítez J, Serrano M, García-Paredes J, Díaz-Rubio M. Debrisoquine oxidation polymorphism in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Ann Med*, 1995;**27**: 555-558.

-Ladero JM, Agúndez JAG, Olivera M, Lozano L, Rodríguez-Lescure A, Díaz-Rubio M, Benítez J. N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and risk of gastric carcinoma. 2001, enviado.

-Ladona MG, Abildua RE, Ladero JM, Roman JM, Plaza MA, Agúndez JA, Muñoz JJ, Benítez J. CYP2D6 genotypes in Spanish woman with breast cancer. *Cancer Lett*, 1996;**99**: 23-28.

-Lang NP, Chu DZ, Hunter CF, Kendall DC, Flammang TJ, Kadlubar FF. Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal cancer. *Arch Surg*, 1986;**121**: 1259-1261.

-Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for N-acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994;**3**: 675-682.

-Lee EDJ, Jeyaseelan K. Frequency of human CYP2D6 mutant alleles in a normal Chinese population. *Br J Clin Pharmacol*, 1994;**37**: 605-607.

-Levy M, Flusser D, Zylber-Katz E, Granit L. Plasma Kinetics of dipyrone metabolites in rapid and slow acetylators. *Eur J Clin Pharmacol*, 1984;**27**: 453-458.

-Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase gene locus. *Pharmacogenetics*, 1994;**4**: 125-134.

REFERENCIAS

-Lin HJ, Probst-Hensch NM, Hughes NC, Sakamoto GT, Louic AD, Kau JH, Lin BK, Lee DB, Lin J, Frankl HD, Lee ER, Hardy S, Grant DM, Haile RW. Variants of *N*-acetyltransferase NAT1 and a case-control study of colorectal adenomas. *Pharmacogenetics*, 1998;**8**: 269-281.

-Lindsay RM, Baty JD. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the in vivo acetylation capacity and the in vitro blood *N*-acetyltransferase activity on the adult male Sprague-Dawley rat. *Biochem Pharmacol*, 1990;**39**: 1193-1197.

-Lindsay RM, Baird JD. The effect of diabetes in the in vivo acetylation capacity of the spontaneous diabetic, insulin-dependent BB/Edinburgh Wistar rat. *Biochem Pharmacol*, 1991;**41**: 425-430.

-Lou YC, Ying L, Bertilsson L, Sjoqvist F. Low frequency of slow debrisoquine hydroxylation in a native Chinese population. *Lancet*, 1987;**2**: 852-853.

-Lower GM, JR, Nilsson T, Nelson CE, Wolf G, Gamsky TE, Bryan GT. *N*-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweeden and Denmark. *Environ Health Perspect*, 1979;**29**: 71-79.

-Marcus PM, Vineis P, Rothman N. NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics*, 2000;**10**: 115-122.

-Marez D, Sabbagh N, Legrand M, Lo-Guidice JM, Boone P, Broly F. A novel *CYP2D6* allele with an abolished splice recognition site associated with poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1995a;**5**: 305-311.

-Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice J-M, Boone P, Broly F. An additional allelic variant of the *CYP2D6* gene causing impaired metabolism of sparteine. *Hum Genet*, 1995b;**97**: 668-670.

REFERENCIAS

- Martínez C, Agúndez JA, Olivera M, Martín R, Ladero JM, Benítez J. Lung Cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics* 1995;**5**: 207-214.
- Martínez C, Agúndez JAG, Olivera M, Llerena A, Ramírez R, Hernández M, Benítez J. Influence of genetic admixture on polymorphisms of drug metabolizing enzymes. Analyses of mutations on *NAT2* and *CYP2E1* genes in a mixed hispanic population. *Clin Pharmacol Ther*, 1998;**63**: 623-628.
- Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J, Ingelman-Sundberg M. A novel mutant variant of the *CYP2D6* gene (*CYP2D6*17*) common in a black African population: association with diminished debrisoquin hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol*, 1996;**42**: 713-719.
- Mattila MJ, Titinen H. The rate of isoniazid inactivation in Finnish diabetic and non-diabetic patients. *Ann Acad Sci Fenn (Med)*, 1967;**45**: 424-427.
- McLaren EH, Burden AC, Moorhead PJ. Acetylator phenotype in diabetic neuropathy. *Br Med J*, 1977;**2**: 291-293.
- Meyer UA. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics*, 1991;**1**: 66-67.
- Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997;**37**: 269-296.
- Mitchell RS, Bell JC. Clinical implications of isoniazid, Pas and streptomycin blood levels in pulmonary tuberculosis. *Trans Am Clin Clim Ass*, 1957;**69**: 98-105.
- Morsiani L, Beretta P, Pareschi PL, Manservigi D, Bottoni L. Lon-term results in preventive medicine for type II diabetes. *Acta Diabetol Lat*, 1985;**22**: 191-202.

REFERENCIAS

- Mrozikiewicz PM, Drakoulis N, Roots I. Polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase (*NAT2*) genes in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther*, 1994;**56**: 626-634.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Funsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gen, mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996;**6**: 1-42.
- Neugebauer S, Baba T, Watanabe T, Ishizaki T, Kurokawa K. The *N*-acetyltransferase (*NAT*) gene: an early risk marker for diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients?. *Diabet Med*, 1994;**11**: 783-8.
- Olsen H, Morland J. Ethanol induced increase in drug acetylation in man and isolated rat liver cells. *Br Med J*, 1978;**2**: 1260-1262.
- Panserat S, Mura C, Gerard N, Vincent-Viry M, Galteau MM, Jacqz-Aigrin E, Krishnamoorthy R. An unequal cross-over event within the *CYP2D* gen cluster generates a chimeric *CYP2D7/CYP2D6* gen wich is associated with the poor metabolizer phenotype. *Br J Clin Pharmacol*, 1995;**40**: 361-367.
- Payton MA, Sim E. Genotyping human *N*-acetyltransferase type 1 (*NAT1*): the identification of two novel allelic variants. *Biochem Pharmacol*, 1998;**55**: 361-6.
- Peters JH, Levy L. Dapsone acetylation in man. Another example of polymorphic acetylation. *Ann N Y Acad Sci*, 1971;**179**: 660-666.
- Pontiroli AE, Calderara A, Bonisoli L, De Pasqua A, Maffi P, Margonato A, Radaelli G, Gallus G, Pozza G. Risk factors for micro- and macro-angiopathic complications in Type 2 diabetes: lack of association with acetylator phenotype, chlorpropamide

REFERENCIAS

alcohol flush and ABO and Rh blood groups. *Diabete Metabolisme (Paris)*, 1987;**13**: 444-449.

-Pozza G, Garancini P, Gallus G. Prevalence and incidence of NIDDM. En: Williams R, Papoz L, Fuller J, eds. *Diabetes in Europe*. London: John Libbey & Co., 1993:21-38.

-Relling MV, Cherrie J, Schell MJ, Petros WP, Meyer WH, Evans WE. Lower prevalence of the debrisoquin oxidative poor metabolizer phenotype in American black versus white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 1991;**50**: 308-313.

-Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN. Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet*, 1996;**347**: 1372-1374.

-Sabbagh N, Brice A, Marez D, Durr A, Legrand M, Lo Guidice J-M, Destee A, Agid Y, Broly F. CYP2D6 polymorphism in familial and sporadic Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, 1996;**17**: 2267-2269.

-Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Reum T, Roots I. A rare insertion of T226 in exon 1 of CYP2D6 causes a frameshift and is associated with the poor metabolizer phenotype: CYP2D6*15. *Pharmacogenetics*, 1996;**6**: 269-272.

-Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JM, Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B. Identification of a new variant CYP2D6 single base pair deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*, 1994;**3**: 923-926.

-Schröder H, Evans DAP. The polymorphic acetylation of sulphapyridine in man. *J Med Genet*, 1972;**9**: 168-171.

-Shenfield GM, McCann VJ, Tjokresetio R. Acetylator status and diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 1982;**22**: 4541-444.

REFERENCIAS

- Skoda RC, González FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450DB1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient of debrisoquine and others drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988;**85**: 5240-5243.
- Sommers K, Moncieff J, Avenant J. Metoprolol alpha-hydroxylation in the SanBushmen of Southern Africa. *Hum Toxicol*, 1989;**8**: 39-43.
- Spurr NK, Gough AC, Chinegwundoh FI, Smith CA. Polymorphism in drug-metabolizing enzymes as modifiers of cancer risk. *Clin Chem*, 1995;**41**: 1864-9.
- Srandberg I, Boman G, Hassler L, Sjoqvist F. Acetylator phenotype in patients with hydralazine-induced lupoid syndrome. *Acta Med Scand*, 1976;**200**: 367-371.
- Stroev EA, Belkina ZV. Effect of antidiabetic preparations on the process of xenobiotic metabolism. *Farmakol Toksikol*, 1989;**52**: 159-164.
- Stryjek-Kaminska D, Malczewski B, Kopec A, Rowinska-Marcinska K. Acetylator phenotypes in diabetes mellitus. *Acta Diabet Latina*, 1988;**25**: 41-48.
- Suhardjono D, Boutagy J, Shenfield GM. The effect of glucose on acetylation status. *Br J Clin Pharmacol*, 1986;**22**: 401-408.
- Sunahara S, Urano M, Ogawa M. Genetical and geographical studies on isoniazid inactivation. *Science*, 1961;**134**: 1530-1531.
- Thom S, Farrow PR, Santoso B, Alberti KG, Rawlins MD. Effect of oral glucose in lime juice on isoniazid kinetics. *Br J Clin Pharmacol*, 1981;**11**: 423.
- Tyndale R, Aoyoma T, Broly F, Matsunaga T, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, Meyer UA, González F. Identification of a new *CYP2D6* allele lacking the codon encoding

REFERENCIAS

Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1991a;**1**: 26-32.

-Tyndale RF, Sunahara R, Inaba T. Neuronal cytochrome P450IID1 (debrisoquine/sparteine type): potent inhibition of activity by (-) cocaine and nucleotide sequence identity to human hepatic P450 gene CYP2D6. *Mol Pharmacol*, 1991b;**40**: 63-68.

-Vatsis KP, Weber WW. Structural heterogeneity of Caucasians *N*-acetyltransferase at the NAT1 gene locus. *Arch Biochem Biophys*, 1993;**301**: 71-76.

-Vatsis KP, Wendell WW, Douglas AB, Dupret JM, Price Evans DA. Nomenclature for *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, 1995;**5**: 1-17.

-Vineis P, Bartsch H, Caporaso N, Harrington AM, Kadlubar FF, Landi MT, Malaveille C, Shiekds PG, Skipper P, Talaska G, Tannenbaum SR. Genetically *N*-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature*, 1994;**369**: 154-156.

-Wang S. Phenotypes and genotypes of debrisoquine hydroxylation polymorphism in Chinese. Master,s thesis. National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan.1992.

-Weber WW. The acetylator genes and drug response. *New York: Oxford Univ. Press.*, 1987.

-Woolsey RL, Drayer DE, Reidenberg MM, Nies AS, Carr K, Oates JA. Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. *New Eng J Med*, 1978;**298**: 1157-1159.

-Yokota H, Tamura S, Furuya H, Kimura S, Watanabe M, Kanazawa I, Kondo I, González FJ. Evidence for a new variant *CYP2D6* allele *CYP2D6J* in a Japanese

REFERENCIAS

population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism.
Pharmacogenetics, 1993;**3**: 256-263.

-Zhao B, Lee EJ, Yeoh PN, Gong NH. Detection of mutations and polymorphism of
N-acetyltransferase 1 gene in Indian, Malay and Chinese populations.
Pharmacogenetics, 1998;**8**: 291-298.