

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA**



***“ESTUDIOS DE FACTORES GENÉTICOS  
Y AMBIENTALES QUE REGULAN EL  
METABOLISMO DE EBASTINA EN  
VOLUNTARIOS SANOS”***

**MEMORIA PRESENTADA**

**POR**

**DÑA. MARÍA SONIA VIZCAÍNO JAÉN  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

***Edita: Universidad de Extremadura  
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3<sup>a</sup>  
Cáceres 10071  
Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>

**D. JULIO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DE FARMACOLOGÍA, DÑA M<sup>a</sup> JESÚS CABALLERO LOSCOS Y D. JUAN ANTONIO CARRILLO NORTE, PROFESORES TITULARES DE FARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.**

CERTIFICAN QUE:

Dña. M<sup>a</sup> Sonia Vizcaíno Jaén ha realizado bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado “ESTUDIOS DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES QUE REGULAN EL METABOLISMO DE EBASTINA EN VOLUNTARIOS SANOS”.

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.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Badajoz a veinte de octubre de dos mil cuatro.

Fdo.: Julio Benítez Rodríguez

Fdo.: M<sup>a</sup> Jesús Caballero Loscos

Fdo.: Juan Antonio Carrillo Norte

*A mis padres*

## **Agradecimientos**

A mis directores de Tesis Doctoral, los profesores D. Juan Antonio Carrillo Norte, D. Julio Benítez Rodríguez y Dña. M<sup>a</sup> Jesús Caballero Loscos, por sus ideas y conocimientos a la hora de desarrollar todo el trabajo de investigación.

A todos mis compañeros del departamento, cuyos nombres sería difícil de recordar sin olvidar alguno de ellos, por su compañerismo, en especial, me gustaría agradecer el apoyo prestado por Guillermo por su paciencia a la hora de contestar numerosas cuestiones planteadas, y cómo no a Rosa, ella siempre supo apoyar cuando se la necesitaba, cada día y a cada rato incluso en los peores momentos, gracias por haber estado aquí.

No podría dejar de mencionar a los voluntarios sanos, que mostraron siempre una brillante y desinteresada colaboración, sin ellos, no hubiera sido posible este trabajo, además quiero destacar los buenos ratos que me hicieron pasar.

A mi grupo de amigas, ellas saben que las he abandonado en muchas ocasiones, sobre todo en estos últimos meses de agobios, pero también saben la ilusión que me hace saber que siempre están ahí.

A mi padre y hermanas, por su paciencia, ánimos, estímulos y por todo lo que representan para mí, sin ellos, no hubiera sido posible.

A mi madre, a la cual va dedicado todo el trabajo, esfuerzo y méritos conseguidos así como todos los que queden por llegar.

Y finalmente, no puedo dejar de mencionar a la persona que siempre está a mi lado, Pablo, gracias por tu constancia, tu energía y tu saber hacer, gracias.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>PÁGINA</b>
INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Conceptos Generales.....	2
2.- Farmacogenética del metabolismo de fármacos: Papel del citocromo P450 (CYP450).....	7
2.1.- El citocromo P4503A.....	14
2.2.- Polimorfismo genético de CYP3A.....	17
2.3.- Efectos de la edad sobre la actividad CYP3A.....	23
2.4- Diferencias sexuales.....	24
2.5- Efecto de la dieta.....	25
2.6- Zumo de pomelo.....	27
2.7.- Implicaciones clínicas del polimorfismo de CYP3A.....	31
3.- Farmacogenética de los transportadores de fármacos.....	34
4.-Ebastina como prueba metabólica.....	36
4.1.- Farmacocinética de ebastina.....	41
OBJETIVOS.....	44
MATERIAL Y MÉTODO.....	46
1.- Instrumental y reactivos empleados en las técnicas de genotipación de los citocromos CYP3A y CYP2J2.....	47
1.1.- Reactivos.....	47
1.2.- Equipamiento.....	47
1.3.- Técnicas de genotipación de CYP2J2.....	47
1.3.1.- Reactivos.....	47
2.- Instrumental y reactivos empleados en la técnica analítica para la determinación de ebastina y metabolitos en orina.....	48
2.1.- Compuestos de referencia.....	48
2.2.- Reactivos.....	48
2.3.- Cromatografía.....	48
2.4.- Espectrometría de masas.....	50
3.- Desarrollo y optimización de las técnicas empleadas.....	51

3.1.- Técnicas de genotipación de CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2.....	51
3.1.1.- Purificación de ADN genómico.....	52
3.1.2.- Genotipación del CYP3A4.....	53
3.1.3.- Genotipación del CYP3A5.....	56
3.1.4.- Genotipación del CYP2J2.....	58
3.1.5.- Frecuencias alélicas del CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 en la población española.....	61
3.2.- Desarrollo y optimización de las técnicas analíticas de cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas (LC/MS).....	62
3.2.a.- Preparación de la muestra de orina.....	62
3.2.b.- Extracción en fase sólida.....	63
3.3.- Cuantificación metabólica.....	64
3.4.- Técnica analítica cromatográfica.....	67
3.4.1.- Protocolo de validación.....	67
3.4.2.- Linealidad del método.....	67
3.4.3.- Recuperación del método.....	67
3.4.4.- Precisión y exactitud del método.....	68
3.4.5.- Sensibilidad del método.....	68
3.5.- Ratios urinarios de ebastina.....	69
3.6.- Análisis de los datos.....	69
4.- Estudio poblacional.....	71
4.1.- Estudio de genotipación CYP3A.4, CYP3A5 y CYP2J2.....	71
4.1.1.- Sujetos.....	71
4.1.2.- Diseño del estudio.....	71
4.2.- Estudio metabólico de ebastina.....	71
4.2.1.- Sujetos.....	71
4.2.2.- Diseño del estudio.....	72
4.3.- Estudio sobre la influencia de factores ambientales en el metabolismo de ebastina: ebastina y zumo de pomelo.....	73
4.3.1.- Sujetos.....	73
4.3.2.- Diseño del estudio.....	73
4.3.3.- Ingesta de zumo de pomelo y ebastina.....	74

5.- Material general de laboratorio empleado en las distintas técnicas.....	75
RESULTADOS.....	77
1.- Validación del método analítico para la determinación de ebastina y metabolitos en orina.....	78
1.1.- Precisión y eficacia.....	80
1.2.- Sensibilidad y selectividad.....	81
2.- Estudio de genotipación de los citocromos P450 3A (CYP3A) y 2J2 (CYP2J2).....	84
2.1.- Frecuencias alélicas del CYP3A4 y CYP3A5 en la población española.....	84
2.2.- Frecuencias alélicas del CYP2J2 en la población española.....	88
3.- Evaluación de la actividad del citocromo CYP3A4 y CYP2J2 en una población de voluntarios sanos.....	91
3.1.- Ratios urinarios de ebastina.....	91
3.1.1.- Diferencias sexuales.....	91
3.1.2.- Tabaco.....	93
4.- Influencia del zumo de pomelo en el metabolismo de ebastina.....	95
4.1.- Análisis de ebastina y metabolitos en orina.....	95
4.2.- Índice de inhibición metabólica.....	99
5.- Estudio correlacional entre el genotipo y el metabolismo de ebastina.....	102
5.1.- Influencia del genotipo sobre el metabolismo de ebastina.....	102
5.1.1.- Diferencias sexuales.....	102
5.1.2.- Tabaco.....	102
5.2.- Influencia del genotipo en el metabolismo de ebastina y zumo de pomelo.....	106
DISCUSIÓN.....	110
1.- Valoración del método de ebastina para el estudio de determinación metabólica.....	112
1.1.- Consideraciones generales.....	113
1.2.- Técnicas de determinación de ebastina.....	115
1.2.1.- Análisis de ebastina y metabolitos en orina.....	115
1.3.- Ratios urinarios de ebastina.....	116
1.4.- Efectos del sexo y el tabaco sobre la actividad del CYP3A y CYP2J2.....	119
2.- Estudio de genotipación de los citocromos P450 3A (CYP3A) y 2J2 (CYP2J2).....	123
2.1.- Frecuencias alélicas del CYP3A4 y CYP3A5 en la población española.....	123



2.2.- Frecuencias alélicas del CYP2J2 en la población española.....	126
3.- Estudio sobre la influencia de factores ambientales en el metabolismo de ebastina: Ebastina y zumo de pomelo.....	129
4.- Influencia del genotipo en el metabolismo de ebastina.....	132
4.1.- Influencia del genotipo en el metabolismo de ebastina y zumo de pomelo.....	134
CONCLUSIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	140

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla I.- Citocromos P-450 más relevantes implicados en el metabolismo de fármacos.....	13
Tabla II.- Variantes alélicas de CYP3A4.....	18
Tabla III.- Variantes alélicas de CYP3A5.....	22
Tabla IV.- Efectos del zumo de pomelo sobre la biodisponibilidad oral de fármacos cuyo metabolismo está principalmente mediado por CYP3A.....	29
Tabla V.- Farmacocinética y farmacodinamia de los antihistamínicos H <sub>1</sub> .....	43
Tabla VI.- Cebadores PCR-RFLP, tamaño del producto de PCR, enzimas de restricción empleadas y tamaño de los fragmentos obtenidos para el genotipo wild type y las variantes alélicas de CYP3A5.....	57
Tabla VII.- Secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores.....	59
Tabla VIII.- Endonucleasas, tiempos de incubación y temperatura para cada alelo CYP2J2 analizado.....	60
Tabla IX.- Productos de PCR y tamaño de fragmentos digeridos obtenido para cada alelo CYP2J2 analizado.....	61
Tabla X.- Concentraciones de los diversos calibradores o patrones empleados para la realización de las distintas curvas de calibración en orina. (Concentraciones expresadas en ng/ml. Pm=peso molecular).....	65
Tabla XI.- Concentraciones de los diversos controles de calidad empleados en orina (Concentraciones expresadas en ng/ml).....	66
Tabla XII.- Coeficientes de variación intra e inter-día para la determinación de ebastina (EBT) y sus metabolitos en orina.....	82
Tabla XIII.- Frecuencia de los genotipos del CYP3A4 y CYP3A5, en una población de voluntarios sanos.....	85
Tabla XIV.- Frecuencia de los genotipos de CYP3A4 y CYP3A5 en mujeres (n=70) y hombres (n=32) de la población española de voluntarios sanos.....	85

Tabla XV.- Combinaciones de los genotipos CYP3A4 y CYP3A5 observados en la población española de voluntarios sanos.....	86
Tabla XVI.-Frecuencias alélicas de CYP3A4*1B y CYP3A5*3 en diferentes poblaciones. Porcentajes de individuos heterocigotos para CYP3A4*1B y mutantes homocigotos para CYP3A5*3 y wild type para ambos genes.....	87
Tabla XVII.- Frecuencia de los genotipos del CYP2J2, en una población española de voluntarios sanos.....	89
Tabla XVIII.- Frecuencia de los genotipos del CYP2J2 en mujeres (n=70) y hombres (n=32) de la población española de voluntarios sanos.....	89
Tabla XIX.- Diferencias en las frecuencias alélicas del gen CYP2J2 en la población española estudiada en comparación con las aparecidas en otras poblaciones.....	90
Tabla XX.- Análisis de la influencia del sexo y el tabaco en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 116 voluntarios sanos, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.....	94
Tabla XXI.- Análisis de la influencia del sexo en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 62 voluntarios sanos, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral con zumo de pomelo.....	96
Tabla XXII.- Eliminación urinaria de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 46 voluntarios sanos no fumadores, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT en estado basal y con zumo de pomelo.....	99
Tabla XXIII.- Comparación del índice metabólico de inhibición entre hombres y mujeres no fumadores.....	101
Tabla XXIV.- Análisis de la influencia del sexo y el tabaco en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en la población de 89 voluntarios sanos genotipados, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.....	103

Tabla XXV.- Análisis de la influencia del genotipo en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en la población de 89 voluntarios sanos genotipados, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.....	105
Tabla XXVI.- Datos metabólicos de ebastina y sus metabolitos en estado basal y durante la ingesta del zumo de pomelo.....	106
Tabla XXVII.- Índices metabólicos inhibitorios de desbutirofenona en 61 voluntarios sanos con diferente genotipo CYP3A.....	108
Tabla XXVIII.- Combinaciones de los genotipos CYP3A4 y CYP3A5 observados en la población de voluntarios sanos (n=62).....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
Figura 1.- Factores que influyen en la respuesta farmacológica.....	3
Figura 2.- Papel de las enzimas metabolizadoras de fármaco, en la bioactivación y biodesactivación de fármacos en el metabolismo de fase I y fase II.....	9
Figura 3.- Concepto del sistema monoxigenasa en el retículo endoplásmico. (R: sustrato).....	10
Figura 4.- Contribución de las enzimas CYP más relevantes en el metabolismo de fármacos. (Adaptado de Rendic y Di Carlo, 1997).....	12
Figura 5.- Rutas metabólicas propuestas para ebastina.....	40
Figura 6.- Productos de la enzima de restricción MboII.....	55
Figura 7.- Análisis PCR-RFLP para el alelo CYP2J2*7.....	61
Figura 8.- Cromatogramas obtenidos a partir de orina blanca extraída conteniendo concentraciones conocidas de EBT y metabolitos. (Concentración: 500 ng/ml).....	79
Figura 9.- Curva de calibración utilizada en la cuantificación de ebastina y sus metabolitos en orina.....	80
Figura 10.- Cromatogramas correspondientes al análisis de orina a las 4 horas de la administración de ebastina oral 20 mg en un voluntario sano [(1) desbutirofenona, (2) EBT, (3) hidroxiebastina, (4) carebastina y (5) IS].....	83
Figura 11.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 24h. [ (F=Mujeres; M=hombres) p<0.0018].....	92
Figura 12.- Influencia del sexo en el metabolismo de carebastina 24h. [(F=Mujeres; M=hombres).p=0.2307].....	92
Figura 13.- Frecuencias de distribución de niveles urinarios de desbutirofenona (A) y carebastina (B) tras la administración de una dosis oral de 20 mg de ebastina en una población caucásica de 116 voluntarios sanos.....	93
Figura 14.- Eliminación urinaria de desbutirofenona y carebastina en estado basal y durante la ingesta de zumo de pomelo. (Basal: ingesta de ebastina con agua).....	97

Figura 15.- Eliminación urinaria de desbutirofenona basal y durante la ingesta de zumo de pomelo en hombres y mujeres. (Basal: ingesta de ebastina con agua).....	98
Figura 16.- Eliminación urinaria de desbutirofenona basal y con zumo de pomelo de hombres y mujeres no fumadores. (NF: no fumadores).....	100
Figura 17.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 4-24h. [ (F=Mujeres; M=Hombres) $p<0,0007$ ]......	103
Figura 18.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 0-24h.....	104
Figura 19.- Asociación genotipo-fenotipo entre los niveles urinarios de desbutirofenona (A) y carebastina (B) y CYP2J2*7, CYP3A4*1B y CYP3A5*3. Se muestran los valores totales en 24 horas.....	105
Figura 20.- Índice de inhibición metabólica para los metabolitos desbutirofenona y carebastina en los 61 voluntarios sanos con diferentes genotipos CYP3A.....	107

**ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA**

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>a.m</b>	antes del meridiano
<b>a.m.u</b>	unidad de masa atómica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AUC</b>	área bajo la curva
<b>Careb</b>	carebastina
<b>CCs</b>	controles de calidad
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CL</b>	aclaramiento
<b>Cmax</b>	concentración máxima
<b>Cols</b>	colaboradores
<b>CV</b>	coeficiente de variación
<b>CYP</b>	citocromo P450 (“Cytochrome P450”)
<b>Desbp</b>	desbutirofenona
<b>df</b>	factor de desviación
<b>DS</b>	desviación estándar
<b>EBT</b>	ebastina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EETs</b>	Ácido epoxieicosatrienoico
<b>ESI</b>	ionización electrospray (“Electrospray ionization”)
<b>h</b>	horas
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta presión (“High Pressure Liquid Chromatography”)
<b>IC</b>	intervalo de confianza
<b>ID</b>	diámetro interno
<b>INH</b>	Isoniazida
<b>IS</b>	estándar interno (“Internal Standard”)
<b>ISRS</b>	inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

<b>kg</b>	kilogramo
<b>LC/MS</b>	cromatografía líquida/ espectrometría de masas (“Liquid Chromatography/ mass spectrometry”)
<b>LLOQ</b>	límite más bajo de cuantificación (“Low limit of quantification”)
<b>MDR1</b>	gen de resistencia a múltiples fármacos (“Multi drug resintant gene”)
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>ML</b>	metabolizador lento (“poor metabolizer”)
<b>MR</b>	Metabolizador rápido (“extensive metabolizer”)
<b>MUR</b>	Metabolizador ultra rápido (“ultra rapid metabolizer”)
<b>Mut</b>	variante alélica mutada
<b>ng</b>	nanogramo
<b>Ohebt</b>	hidroxiebastina
<b>pb</b>	pares de bases
<b>p.ej.</b>	por ejemplo
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)
<b>Pg-p</b>	glicoproteína P
<b>Pm</b>	peso molecular
<b>Prm</b>	promotor
<b>RFLP</b>	Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (“restriction fragment lenght polymorphism”)
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RSD</b>	desviación estandar relativa
<b>SNPs</b>	polimorfismo de base única (“Single nucleotide polymorphism”)
<b>SPE</b>	extracción en fase sólida (“Solid Phase Extraction”)
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>wt</b>	variante alélica silvestre (wild type)
<b><math>\chi^2</math></b>	chi cuadrado
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	microgramos



$\mu\text{l}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar

# **INTRODUCCIÓN**

## 1.- CONCEPTOS GENERALES

---

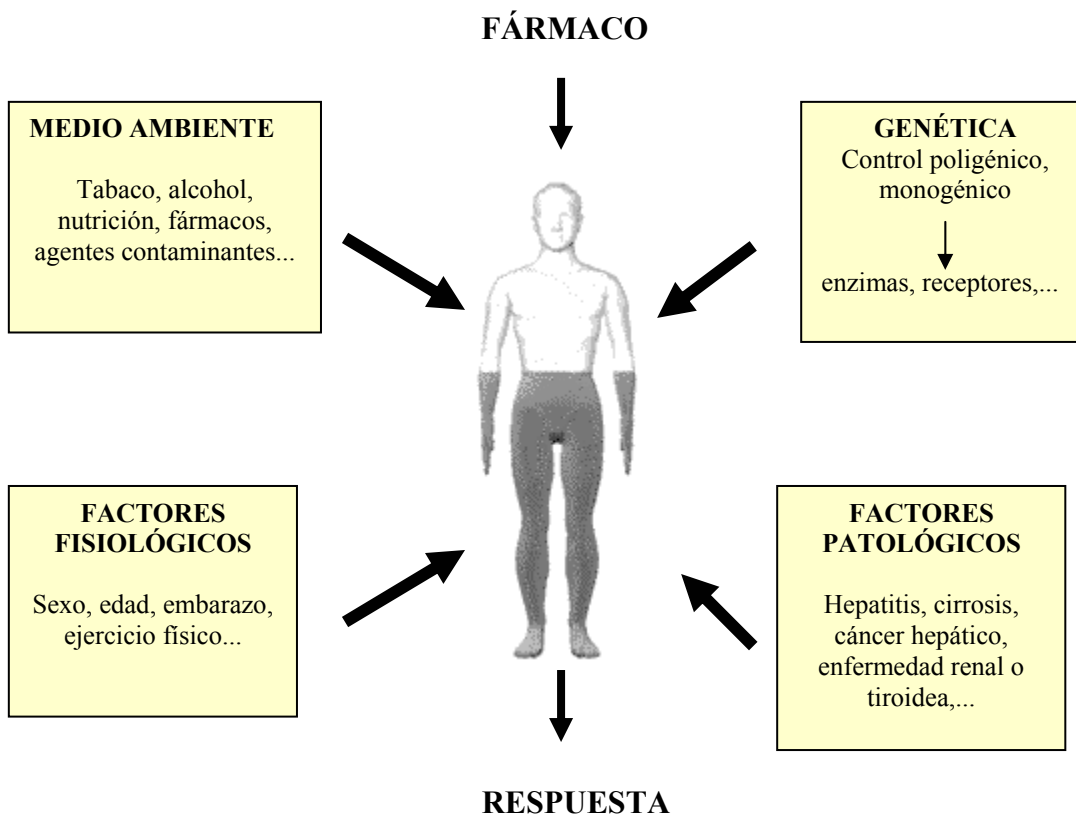
Factores como los caracteres genéticos, el sexo, la edad y enfermedades tales como la insuficiencia renal o hepática, pueden influir en la respuesta a los fármacos en cada persona. Algunas de esas fuentes de variabilidad son relativamente fáciles de caracterizar en la inclusión de individuos en los estudios, como por ejemplo, la edad, sexo o polimorfismos genéticos bien conocidos, para los que se dispone de fármacos de prueba. Otras, como la función hepática son más difíciles de definir en cuanto a su influencia sobre la farmacocinética y los efectos farmacológicos.

Los factores medioambientales pueden tener también una profunda influencia en el comportamiento y efectos de un fármaco. Alguno de esos factores son de naturaleza más individual, como el tabaco y el alcohol, mientras que otros están unidos al marco cultural, incluyendo la comida o la valoración personal de los efectos secundarios. En general, con la posible excepción del tabaco, el impacto de tales factores en los resultados de un estudio es difícil de cuantificar. Además, otros factores medioambientales como los contaminantes, condiciones meteorológicas, diagnósticos aproximados o actitud frente a los medicamentos, juegan también un papel importante, pero su efecto sobre los resultados de estudios clínicos y en patrones de medicación usados en la población general, son casi imposible de evaluar.

La farmacogenética constituye el estudio de las variaciones genéticamente determinadas en relación con la respuesta a los fármacos. Existe una gran variabilidad en cuanto al metabolismo de fármacos. Esta variabilidad puede influir en la respuesta farmacológica, susceptibilidad a sufrir efectos adversos, e incluso en la capacidad de padecer enfermedades inducidas por fármacos, así como algunos tipos de cáncer producidos por productos químicos. La capacidad de cada persona para metabolizar una sustancia vendrá

determinada fundamentalmente por la constitución genética individual y el medio ambiente (Fig. 1).

**Figura 1.- Factores que influyen en la respuesta farmacológica.**



Por otro lado, también se puede clasificar la variabilidad según concierna al propio individuo (intraindividual) o a su relación con el resto de la población (interindividual). Los individuos, aparte de los factores mencionados anteriormente, también se diferencian en cuanto a sus estilos de vida. Al mismo tiempo, las condiciones somáticas de un individuo pueden cambiar con el tiempo. Factores nutricionales, medicación y ejercicio, pueden variar día a día, o incluso hora a hora.

Los factores genéticos son importantes ya que pueden causar cambios en la estructura y función de las diferentes dianas farmacológicas; estos cambios pueden ser de carácter poligénico o monogénico. En el caso de un solo gen (monogénico) se conocen dos clases diferentes de polimorfismos farmacogenéticos: 1) los polimorfismos comunes, y 2) los polimorfismos raros.

El término **polimorfismo genético** hace referencia a un determinado carácter que se hereda de forma monogénica (mendeliana) y que en la población general viene determinado por la existencia de al menos dos fenotipos (distribución bimodal), y presumiblemente dos genotipos, ninguno de los cuales ocurre con una frecuencia menor del 1%. La mayoría de los individuos homocigotos con alelos dominantes y heterocigotos expresan el mismo fenotipo, mientras que los individuos homocigotos con alelos recesivos presentan en general otro fenotipo diferente.

Se estima que el 47-61% de todos los “*loci*” proteicos son polimórficos. Este fenómeno es relativamente frecuente en los genes que expresan dianas farmacológicas (receptores, canales iónicos) o proteínas involucradas en el metabolismo o transporte de los fármacos y metabolitos. Esto condiciona, al menos en parte, la aparición de respuestas diferentes al mismo fármaco como consecuencia de una alteración a nivel farmacodinámico y/o farmacocinético resultante de la expresión de un determinado polimorfismo genético en las enzimas que metabolizan fármacos, transportadores de membrana y/o en los receptores farmacológicos (Meyer, 2000), (Ingelman-Sundberg, 2001).

La genética molecular y la genómica han transformado la farmacogenética en la pasada década. Los dos alelos que porta un individuo para un gen determinado, hacen referencia al **genotipo**, el cual es caracterizado a nivel de ADN; la influencia que ejerce dicho genotipo sobre la cinética de un fármaco o la función de los receptores, es lo que se denomina

*fenotipo*, el cual puede medirse mediante avanzados métodos analíticos para detección de metabolitos o mediante otras sofisticadas investigaciones clínicas, p.ej. estudios de densidad de receptor mediante tomografía de emisión de positrones. Los estudios moleculares en farmacogenética que comenzaron con la caracterización de CYP2D6, (Gonzalez y cols., 1988b, Meyer y Zanger, 1997), se han extendido a numerosos genes humanos, incluyendo más de 20 enzimas metabolizadoras de fármacos, receptores y varios sistemas transportadores de fármacos ([www.sciencemag.org/feature/data/1044449.shl](http://www.sciencemag.org/feature/data/1044449.shl)).

Determinadas variantes alélicas pueden diferir de la forma natural, en general más frecuente del gen (wild-type) en una o varias mutaciones, lo cual también incluye deleciones en el gen, duplicaciones y multiplicaciones. Las mutaciones pueden no tener efecto sobre la actividad del enzima o pueden codificar enzimas con menor actividad o ausencia de la misma; las duplicaciones del gen conducen a un incremento en la actividad. Los metabolizadores rápidos se definen como individuos homocigotos o heterocigotos para el genotipo wild type, los metabolizadores intermedios (Raimundo S, 2000) o metabolizadores lentos son portadores de dos alelos con menor actividad o con pérdida de función respectivamente, y los metabolizadores ultrarápidos son portadores de genes activos duplicados o multiplicados (Ingelman-Sundberg y cols., 1999, Meyer y Zanger, 1997). Aunque el número y complejidad de las mutaciones es muy extenso, solo un grupo de genes mutantes, normalmente de tres a cinco alelos, son comunes. Estos alelos pueden ser determinados por modernos métodos de ADN, permitiendo incluir a la mayoría de los pacientes en un determinado grupo fenotípico.

Los fenotipos metabolizador lento, para la mayoría de los genes polimórficos son tratados como autosómicos recesivos, requiriendo la presencia de dos alelos mutantes. Cuando la respuesta a un tratamiento es monogénica (depende de un solo gen), el efecto fenotípico presentado, divide la población en dos o tres grupos distintos. Sin embargo, las

respuestas de la mayoría de los fármacos no son monogénicas, sino que implican múltiples genes. La herencia poligénica es más difícil de determinar y de distinguir que los factores ambientales. El análisis de la herencia poligénica es similar al estudio de enfermedades complejas tales como el cáncer, enfermedades mentales, artritis y asma, en las cuales los genes primarios, los genes modificadores, y los factores ambientales interaccionan (Brookes, 1999, Roses, 2000).

Un método sencillo para distinguir entre los componentes de la variabilidad hereditaria o ambiental es la comparación de series monocigotas o dicigotas en gemelos, así como la repetición en la administración de fármacos y comparación de la variabilidad en la respuesta intra e interindividual como propuso Kalow (Kalow y cols., 1998). Las técnicas han revelado importantes factores genéticos en la farmacocinética de fármacos tales como dicumarol, halotano, fenitoína, tolbutamida, y midazolam.

En el futuro, el descubrimiento farmacogenético cambiará con las nuevas tecnologías en genómica. La rápida secuenciación y el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) tendrán un mayor papel en las variaciones clínicas fenotípicas en la respuesta a los fármacos. Un SNP ocurre aproximadamente en uno de cada 100-1500 pares de bases (pb) del genoma si dos individuos no relacionados son comparados. Los SNPs comunes son aquellos que ocurren a frecuencias mayores al 1%. Una vez que todos los SNPs y su frecuencia en las diferentes poblaciones se conozcan, podrá correlacionarse la genética del paciente con su respuesta al fármaco (Brookes, 1999, Roses, 2000). SNPs en las regiones codificadoras de los genes pueden causar cambios en los aminoácidos y cambios en la función de proteína, o pueden ser neutrales. SNPs dentro del gen, o en regiones reguladoras pueden causar diferencias en la expresión de las proteínas. La capacidad de predecir las diferencias interindividuales en la

eficacia de un fármaco o su toxicidad basado en los factores genéticos será el futuro escenario de los tratamientos farmacológicos.

## **2.- FARMACOGENÉTICA DEL METABOLISMO DE FÁRMACOS: PAPEL DEL CITOCROMO P450 (CYP450)**

---

Son múltiples los mecanismos a través de los cuales un fármaco puede ser modificado en el organismo, a través de procesos farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo (hepático e intestinal fundamentalmente), y eliminación, con la correspondiente repercusión a nivel farmacodinámico, y en la respuesta farmacológica.

Nuestro estudio se va a centrar en el metabolismo de los fármacos, fundamentalmente en metabolismo hepático.

El hígado es el principal órgano relacionado con el metabolismo de los fármacos, muchos de ellos son los sustratos para las enzimas o bien pueden alterar la actividad de éstas a través de la inducción o inhibición de los sistemas enzimáticos microsomales hepáticos. Localizadas también en riñón, pulmón, mucosa intestinal, plasma y tejido nervioso, promueven la eliminación de sustancias liposolubles al ser transformadas en compuestos más polares que pueden ser excretados más fácilmente fuera del organismo a través de la orina o bilis (Caccia y Garattini, 1990). Los fármacos hidrosolubles se eliminan sin modificarse por la orina y permanecen poco tiempo en el organismo, sin embargo los fármacos liposolubles no son metabolizados tan fácilmente y permanecen durante más tiempo en el organismo. Los principales citocromos P450 (CYP) relacionados con el metabolismo de fármacos pertenecen a las familias CYP1, CYP2 y CYP3 (Brosen, 1995), así la actividad de éstas enzimas varía



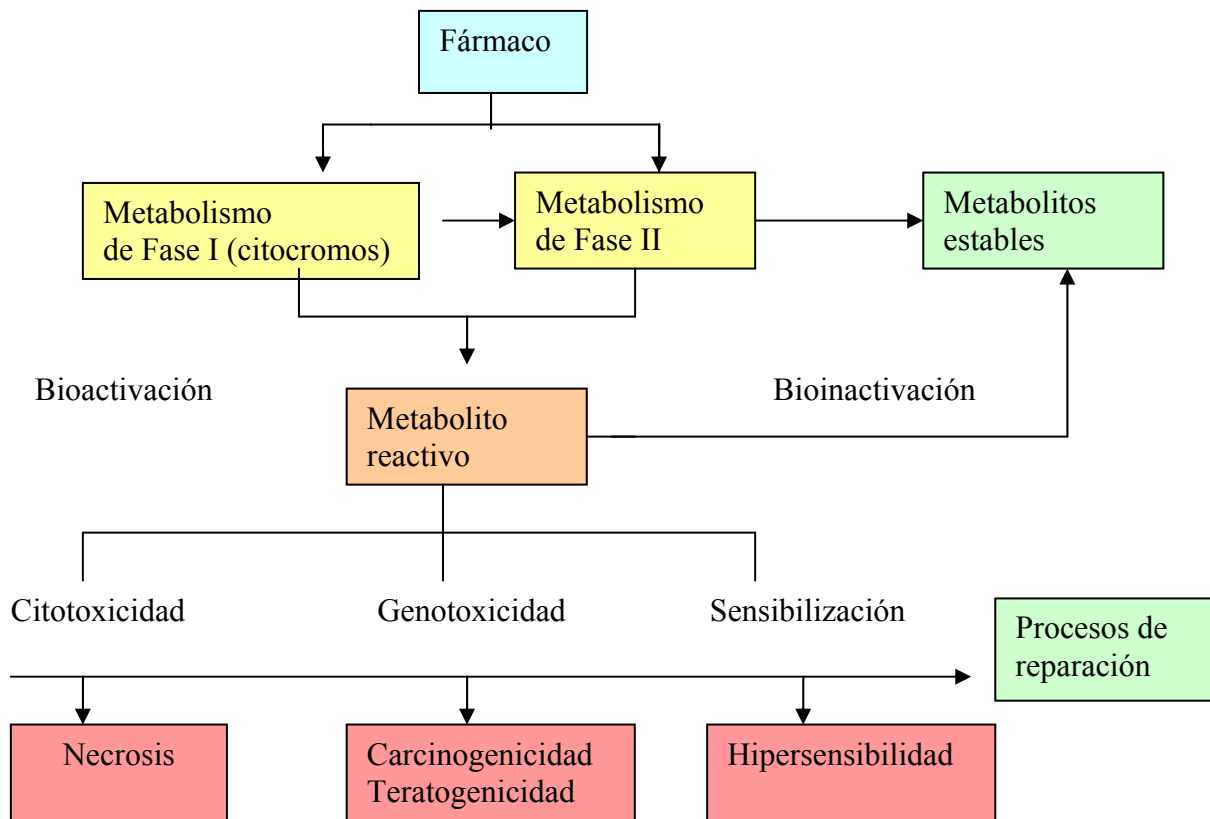
entre los individuos y entre grupos étnicos. Las reacciones que sufren los fármacos durante su metabolismo se encuentran divididas en dos fases:

a) Las reacciones de fase I, son aquellas en las cuales las enzimas que participan causan un cambio en la molécula del fármaco; por ejemplo reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, estas incluyen a las reductasas, oxidasas e hidrolasas. Los citocromos P450 pertenecientes a las familias 1, 2 y 3 participan en el 70-80% de todas las reacciones metabólicas de fase I relacionadas con la biotransformación de los fármacos, que se utilizan habitualmente en la práctica clínica.

b) Las reacciones de fase II, las cuales comprenden todas las enzimas que son transferasas ya que transfieren grupos como sulfatos, glutatión, aminoácidos y metilos a los fármacos que han sido metabolizados por enzimas de fase I (Gonzalez y Gelboin, 1994), estas enzimas llevan a cabo reacciones de conjugación, en las cuales hay formación de un conjugado con el fármaco y/o el metabolito producido en las reacciones de fase I.

La deficiencia de un enzima metabolizadora de un determinado fármaco, conduce a un aumento en el riesgo de toxicidad farmacológica debido a una eliminación deficiente de dicho fármaco, como se observa en la figura 2.

**Figura 2.- Papel de las enzimas metabolizadoras de fármaco, en la bioactivación y biodesactivación de fármacos en el metabolismo de fase I y fase II. (Pirmohamed y cols., 1996).**

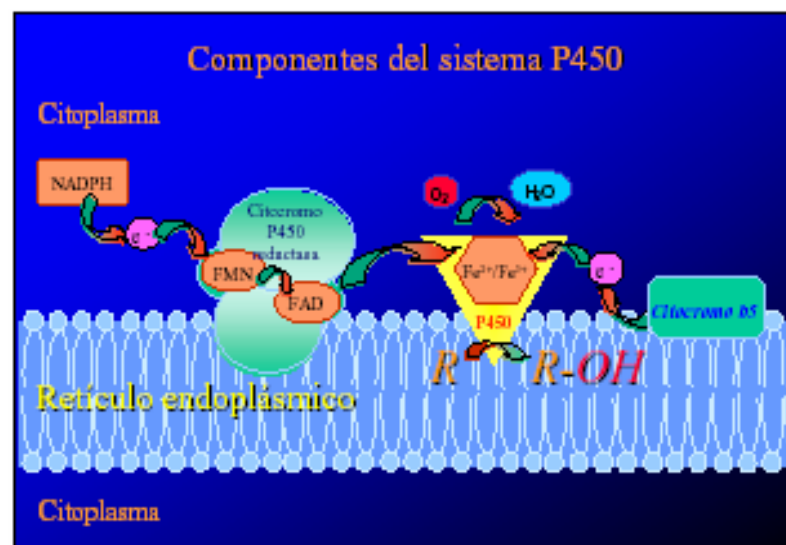


En 1958 Klingenberg descubrió un pigmento al que más tarde se llamó CYP450, (Klingenberg, 1958). Omura y Sato (Omura y Sato, 1964a, Omura y Sato, 1964b) demostraron que el pigmento era un citocromo y lo llamaron P450, ya que presentaba un pico espectral a 450 nm cuando se reducía y se enlazaba con el monóxido de carbono.

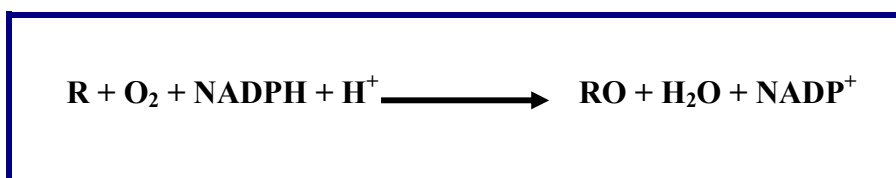
Uno de los procesos más importantes en el metabolismo de fármacos es la oxidación, y el principal sistema enzimático que lleva a cabo esta función son las monooxigenasas de función mixta.

Este sistema enzimático se encuentra localizado en los mamíferos en el retículo endoplásmico y las membranas mitocondriales. En general, las monooxigenasas de función mixta comprenden: una hemoproteína, denominada P450, un componente flavoproteico (NADPH citocromo P450 reductasa) y un componente lipídico (Woolf y Jordan, 1987) (Fig. 3).

Figura 3.- Concepto del sistema monooxigenasa en el retículo endoplásmico. R: sustrato



Las reacciones en las que están implicadas las monooxigenasas de función mixta se pueden resumir mediante la siguiente ecuación:



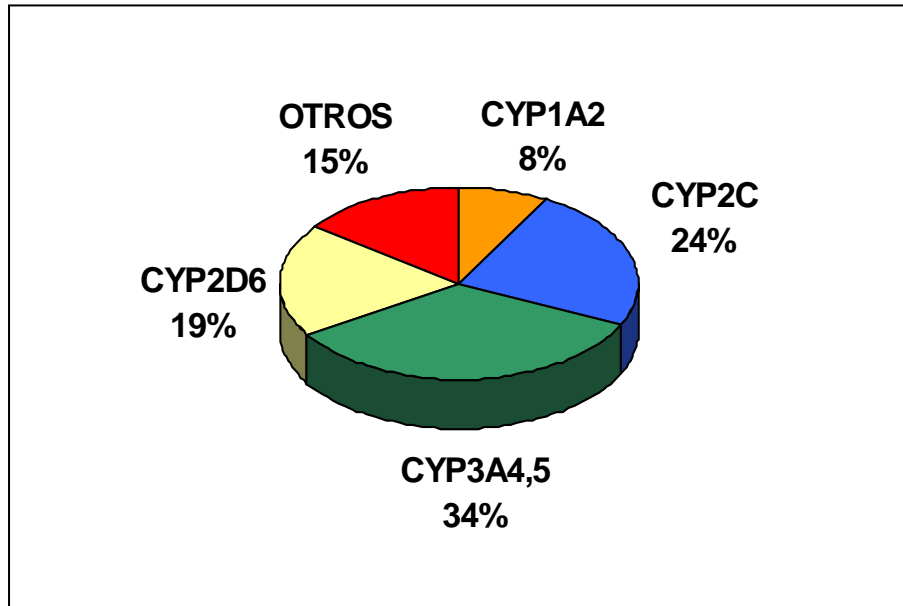
Se han descrito 481 genes y 22 pseudogenes del citocromo P450, agrupándose en 74 familias (Nelson y cols., 1996). Dada la notable diversidad de enzimas encontradas, se ha dado paso a una clasificación sistemática de formas individuales en familias y subfamilias. La

secuencia proteínica dentro de una familia es idéntica al menos en un 40% (p.e. CYP2A6 y CYP2B6), y las secuencias proteínicas dentro de una misma subfamilia son similares aproximadamente en un 55% (p.e. CYP2A6 y CYP2A7), (Nelson y cols., 1996).

De estas familias, 16 se han encontrado en mamíferos, dividiéndose estas a su vez en 26 subfamilias, 23 de las cuales han sido localizadas en el genoma humano. Estas últimas se podrían dividir en dos clases: aquellas familias que participan en la síntesis de esteroides y ácidos biliares y las que principalmente metabolizan xenobióticos. En humanos, existen tres familias mayoritarias (>40% homología) de las enzimas, de las cuales 7 isoformas son las responsables de la mayor parte del metabolismo identificado mediado por citocromos: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8/9/10, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4. La fracción correspondiente a cada isoforma se ha caracterizado en microsomas hepáticos por Shimada y cols (Shimada y cols., 1994).

En la figura 4 se representa la contribución de las enzimas CYP más importantes al metabolismo de fármacos con relevancia clínica.

El citocromo P450 (CYP450) es, asimismo, responsable de convertir algunos profármacos en sus metabolitos farmacológicamente activos.

**Figura 4.- Contribución de las enzimas CYP más relevantes en el metabolismo de fármacos**

Adaptado de Rendic y Di Carlo, 1997.

Se ha formulado la hipótesis de que las enzimas P450 que metabolizan xenobióticos probablemente evolucionaron de las esteroideogénicas para empezar a degradar oxidativamente sustancias químicas de la dieta que no eran fácilmente eliminables, a menos que se transformaran en derivados más hidrofílicos (Nelson y Strobel, 1987); (Nebert y cols., 1989); (Gonzalez y Meyer, 1991). En la tabla I, podemos ver los citocromos P-450 más relevantes y los sustratos para los cuales, dichos citocromos están implicados de forma parcial o total.

**Tabla I.- Citocromos P-450 más relevantes implicados en el metabolismo de fármacos .**

Enzimas	Sustratos
CYP1A2	Antidepresivos: amitriptilina, clomipramina, fluvoxamina, imipramina, mianserina, mirtazapina Antipsicóticos: clozapina, haloperidol, olanzapina, tioridazina Metilxantinas: cafeína, teofilina Miscelánea: fenacetina, paracetamol, propranolol, ropivacaína, tacrina, R-warfarina, zolmitriptán
CYP2C9	AINES: celecoxib, diclofenac, ibuprofen, meloxicam, S-naproxen, piroxicam, suprofen AOs: glibornurida, glipizida, rosiglitazona, tolbutamida ARA II: irbesartán, losartán Miscelánea: amitriptilina, fenitoína (4-OH), fluoxetina, fluvastatina, tamoxifen, torasemida, (S)-warfarina
CYP2C19	Antidepresivos: amitriptilina, citalopram, clomipramina, fluoxetina, imipramina, moclobemida Antiepilépticos: diazepam, fenitoína, fenobarbitona, S-mefenitoína Inhibidores bomba protones: lansoprazol, omeprazol, pantoprazol Miscelánea : carisoprolol, ciclofosfamida, hexobarbital, indometacina, R-mefobarbital, nelfinavir, nilutamida, primidona, progesterona, proguanil, propranolol, tenipósido, (R)-warfarina
CYP2D6	Antiarrítmicos: diltiazem, encainida, esparteína, flecainida, lidocaína, mexiletina, propafenona Antidepresivos: amitriptilina, clomipramina, desipramina, fluoxetina, fluvoxamina, imipramina, maprotilina, mianserina, minaprina, norriptilina, paroxetina, trazodona, venlafaxina Antipsicóticos: clorpromazina, haloperidol, perfenazina, olanzapina, remoxiprida, risperidona, sertindol, tioridazina, zuclopentixol Beta-bloqueantes: alprenolol, bufuralol, carvedilol, S-metoprolol, pindolol, propranolol, timolol Miscelánea: anfetamina, clorfeniramina, codeína, debrisoquina, dexfenfluramina, dextrometorfán, fenacetina, fenformina, guanoxán, metoclopramida, metoxianfetamina, ondansetrón, perhexilina, tamoxifén, tramadol
CYP3A4	Antiarrítmicos: lidocaína, propranolol, quinidina Antidepresivos: amitriptilina, clomipramina, imipramina, mirtazapina, nefazodona, sertralina, trazodona Anti HIV: indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir Antihistamínicos: ebastina, astemizol, clorfeniramina, terfenadina Antipsicóticos: clozapina, haloperidol, pimozida, risperidona, sertindol, quetapina, ziprasidona Benzodiazepinas: alprazolam, diazepam, midazolam, triazolam Bloqueantes canales calcio: amlodipino, diltiazem, felodipino, lercanidipino, nifedipino, nisoldipino, nitrendipino, verapamil Estatinas: atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, sinvastatina Esteroides: (6-beta-OH): cortisol, estradiol, progesterona, testosterona Inmunosupresores: ciclosporina, tacrólimo (FK506) Macrólidos: claritromicina Procinético: cisaprida Miscelánea: alfentanil, cocaína, dapsona, codeína, dextrometorfano, finasterida, irinotecán, metadona, odansetrón, omeprazol, quinina, salmeterol, sildenafilo, sirolimo, tamoxifén, taxol, vincristina, zolpidem

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

AOs: Antidiabéticos orales.

ARA II: Antagonistas de los receptores de angiotensina tipo II.

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana.

Los miembros de la subfamilia CYP3A, representan el grupo de enzimas metabolizadoras de fármacos más importante en humanos. Debido a que constituyen el 30% aproximadamente del contenido enzimático en el hígado y el elevado número de sustratos que metaboliza, así como los diversos órganos en los que se localiza, hemos centrado nuestro interés en esta subfamilia, especialmente en las isoformas CYP3A4 y CYP3A5, con el fin de poder clarificar algunos aspectos sobre variabilidad interindividual y sus posibles repercusiones clínicas.

## **2.1- El citocromo P450 3A**

Las isoenzimas de la subfamilia P450 (CYP3A) son las enzimas que predominan en la fase I del metabolismo de fármacos en el hombre, además estas isoenzimas también metabolizan otros compuestos como hormonas esteroideas, presentando un alto grado de estereoselectividad (Maenpaa y cols., 1991), toxinas y carcinógenos, dichas enzimas están presentes tanto en hígado como en localizaciones extrahepáticas: tracto gastrointestinal, placenta, feto, útero, riñón, pulmón o cerebro (Watkins, 1994), (Rendic y Di Carlo, 1997), (Farin y Omiecinski, 1993).

Esta subfamilia se compone de al menos 3 genes diferentes: CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7 (Wrighton y Stevens, 1992), CYP3A43 también se ha identificado recientemente, aunque su importancia metabólica es, por ahora, más que discutible. De estas enzimas, CYP3A4 es la principal, representando el 30% del total del citocromo P450 en el hígado (Wrighton y Stevens, 1992), CYP3A5, no es un citocromo exclusivo en el hígado e intestino, encontrándose también en riñón (Haehner y cols., 1996, Schuetz y cols., 1992), pulmón (Kivisto y cols., 1996), próstata (Yamakoshi y cols., 1999), mama (Huang y cols., 1996) y en

leucocitos polimorfonucleares (Janardan y cols., 1996), y presenta una actividad catalítica muy similar, mientras que CYP3A7 es la forma enzimática predominante en el hígado fetal humano, representando alrededor del 50% del CYP450 hepático fetal total (Wrighton y Stevens, 1992), (Nelson y cols., 1993). A partir del primer año de edad CYP3A7 reduce sus niveles en el hígado hasta niveles mínimos (Tateishi y cols., 1997). Debido a la gran similitud catalítica entre CYP3A4 y CYP3A5, así como a la casi exclusiva localización fetal de CYP3A7, estas enzimas se suelen denominar conjuntamente como CYP3A. Según los últimos estudios, gana terreno la idea de un papel más preponderante del pensado hasta ahora para CYP3A5 en la actividad total de CYP3A (Kuehl y cols., 2001). Al igual que otros genes de esta familia, CYP3A5, parece presentar polimorfismo genético (Wrighton y cols., 1989).

Debido a la gran cantidad de fármacos metabolizados por esta enzima, la importancia clínica de este citocromo es obvia (tabla I). Por ejemplo, en la terapia farmacológica post-transplante, muchos de los inmunosupresores utilizados, por ejemplo tacrolimo o ciclosporina, son sustratos de CYP3A, y a menudo de la glicoproteína P (P-gp) en el tracto gastrointestinal, de manera que el uso de otros fármacos en dicha terapia, por ejemplo esteroides, que alteren la actividad de CYP3A y/o P-gp, pueden afectar a los niveles del inmunosupresor, demandando un ajuste de su dosis para alcanzar el efecto terapéutico o evitar efectos adversos (Anglicheau y cols., 2003).

Igualmente, la participación de CYP3A en el metabolismo de la mayor parte de las estatinas hace que la inhibición de la enzima sea clave en el aumento de los niveles plasmáticos de estos hipocolesterolemiantes, provocando así un riesgo de miopatía que potencialmente puede llegar a ser fatal (Vlahakos DV, 2002).

De gran importancia clínica son asimismo las interacciones mediadas por el CYP3A que desembocan en *Torsades de Pointes* (arritmias graves ventriculares que se manifiestan



con una prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma). Este efecto adverso se ha observado tras el aumento de los niveles plasmáticos de ciertos sustratos de CYP3A (ej. terfenadina, astemizol o cisaprida) debido a la administración de fármacos u otras sustancias inhibitoras de su metabolismo (Monahan y cols., 1990), (Tsai y cols., 1997).

Por otro lado, el amplio espectro de fármacos metabolizados por el CYP3A también posibilita terapias que, mediante alteración de la actividad enzimática, producen unas consecuencias clínicas beneficiosas, ya sea por ahorro de coste económico, por ejemplo el aumento controlado de los niveles de ciclosporina mediante inhibición de su metabolismo reduce la dosis necesaria de inmunosupresor (First y cols., 1993), ya sea por aumento de eficacia, este es el caso de la terapia combinada de los inhibidores de la proteasa ritonavir y saquinavir, la eficacia del tratamiento aumenta exponencialmente en comparación con la monoterapia, probablemente por la inhibición combinada de CYP3A4 y P-gp (Merry y cols., 1997).

En la biodisponibilidad oral de varios sustratos de CYP3A como el midazolam, se observan grandes diferencias tanto inter como intraindividuales atribuibles a un metabolismo de primer paso. Aunque este efecto de primer paso se atribuía en principio mayoritariamente al hígado, el descubrimiento de que CYP3A4 está presente en gran medida en el epitelio luminal del intestino delgado (Watkins y cols., 1987), (Kolars y cols., 1992), (Kolars y cols., 1994), ha provocado que se reconozca también la contribución del intestino al metabolismo de primer paso. Este efecto de primer paso es de especial importancia si el fármaco sustrato de la enzima tiene un estrecho margen terapéutico, como es el caso de la ciclosporina (Kahan, 1985), (Ptachcinski y cols., 1986).

En resumen, el citocromo CYP3A comprende el grupo más importante de enzimas metabolizadoras de fármacos que existe. Descubrir las bases de la gran variabilidad

interindividual observada, ya sea por causas genéticas, ambientales o causada por xenobióticos, puede ayudar a evitar numerosas interacciones que acarrear efectos adversos o fallos terapéuticos clínicamente importantes.

## **2.2.- Polimorfismo genético de CYP3A**

El estudio del aclaramiento de los fármacos mediado por CYP3A es extenso, debido en parte a la importante contribución de CYP3A al metabolismo de primer paso y la baja biodisponibilidad sistémica de los fármacos administrados oralmente (Shen y cols., 1997), y también como consecuencia de la susceptibilidad de CYP3A a los efectos de numerosos fármacos que tanto pueden inducir como inhibir su actividad catalítica (Guengerich, 1997, Thummel y Wilkinson, 1998). Para muchos fármacos, la actividad CYP3A contribuye a la mayor parte del aclaramiento total corporal. De acuerdo con esto, la variabilidad interindividual en el contenido del enzima o su función puede tener un profundo efecto sobre la exposición sistémica a un fármaco y, potencialmente sobre la eficacia y seguridad del mismo. En adultos, el CYP3A4 es la enzima CYP3A dominante en hígado e intestino delgado (aparte de otros órganos) pero su expresión es claramente polimórfica, lo cual hace que los individuos presenten unos niveles de proteína relativamente altos o bajos. (Paine y cols., 1997, Wrighton y cols., 1990). CYP3A5 se encuentra también polimórficamente expresado en hígado fetal (Hakkola y cols., 2001).

Las variaciones genéticas encontradas en la región promotora, exones o intrones del gen, pueden repercutir en el nivel de función de la proteína CYP3A4, aunque en todos los adultos estudiados, se ha detectado la longitud completa del mRNA. Gonzalez y cols., identificaron hasta cinco polimorfismos diferentes de un solo nucleótido (SNPs) en la región

reguladora-5' de CYP3A4 (tabla II), (Gonzalez y cols., 1988a). Hasta la fecha, la mutación más común es A-392G (CYP3A4\*1B) en el posible elemento de respuesta al nifedipino (NFSE), (Rebbeck y cols., 1998). La frecuencia alélica CYP3A4\*1B varía entre los diferentes grupos étnicos: 0% en taiwaneses (Walker y cols., 1998), chinos (Hsieh y cols., 2001), chinos y japoneses americanos (Ball y cols., 1999); 2-9.6% en caucásicos (Ball y cols., 1999, Garcia-Martin y cols., 2002, Hsieh y cols., 2001, Walker y cols., 1998); 9.3-11% en hispano-americanos (Ball y cols., 1999, Paris y cols., 1999); y 35-67% en afro-americanos (Ball y cols., 1999, Kuehl y cols., 2001, Lamba y cols., 2002, Sata y cols., 2000, Walker y cols., 1998).

**Tabla II.- Variantes alélicas de CYP3A4**

Alelos	Localización del nucleótido	Sustitución del aminoácido	Caucásicos	Afro-americanos	Otros	Refs
CYP3A4*1						(Gonzalez y cols., 1988a)
CYP3A4*1B	5'UTR A-392G		2-9.6%	35-67%	Japoneses 0%	(Kuehl y cols., 2001)
CYP3A4*1C	5'UTR T-444G		1%	0%	Chinos 0%	(Sata y cols., 2000)
CYP3A4*1D	5'UTR C-62A		1%	0%	Hispanos 9.3-11%	(Sata y cols., 2000)
CYP3A4*1E	5'UTR T-369A		<1%			(Hamzeiy y cols., 2002)
CYP3A4*1F	5'UTR C-747G		20%		Iraníes 18%	(Hamzeiy y cols., 2002)
CYP3A4*2	Exon 7	S222P	2.7%	0%	Chinos 0%	(Sata y cols., 2000)

Alelos	Localización del nucleótido	Sustitución del aminoácido	Caucásicos	Afro-americanos	Otros	Refs
CYP3A4*3	Exon 12 T1334G	M445T	0.47-4%		Chinos 1.5%	(Sata y cols., 2000)
CYP3A4*4	Exon 5 A352G	I118V			Chinos 1.5%	(Hsieh y cols., 2001)
CYP3A4*5	Exon 7 C653G	P218R			Chinos 0.98%	(Hsieh y cols., 2001)
CYP3A4*6	Exon 9 831 insA	Stop codon at 285			Chinos 0.5%	(Hsieh y cols., 2001)
CYP3A4*7	Exon 3 G167A	G56D	1.41			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*8	Exon 5 G389A	R130Q	0.33			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*9	Exon 6 G508A	V170I	0.24			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*10	Exon 6 G520C	D174H	0.24-2%	2%	Mejicanos 55%	(Lamba y cols., 2002)
CYP3A4*11	Exon 11 C1088T	T363M	0.34%			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*12	Exon 11 C1117T	L373F	0.34%			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*13	Exon 11 C1247T	P416L	0.34%			(Eiselt y cols., 2001)
CYP3A4*14	Exon 1 T44C	L15P	0%	2-4.2%	Asiáticos 0%	(Hamzeiy y cols., 2002)
CYP3A4*15A	Exon 6 G485A	R162Q	<1%		Asiáticos 0%	(Lamba y cols., 2002)
CYP3A4*15B	A-392G, G485A	R162Q			Mejicanos 5%	(Lamba y cols., 2002)
CYP3A4*16	Exon 7 C554G	T185S			Japoneses 5%	
CYP3A4*17	Exon 7 T566C	F189S	2.1%	0%	0%	(Dai y cols., 2001)
CYP3A4*18	Exon 10 T878C	L293P	0%	0%	Chinos 10%	(Dai y cols., 2001)
CYP3A4*19	Exon 12 C1399T	P467S	0%	0%	Indo-Pakistanies 12%	(Dai y cols., 2001)

**Tabla II. Continuación\*UTR: región no codificadora del gen.**

Las otras variantes alélicas en la región reguladora-5' suelen tener una frecuencia mucho menor en caucásicos: CYP3A4\*1C (1%), CYP3A4\*1D (1%), CYP3A4\*1E (<1%), y CYP3A4\*15B (<1%) (Hamzeiy y cols., 2002, Kuehl y cols., 2001), con la excepción de CYP3A4\*1F (20%) (Hamzeiy y cols., 2002). En afro-americanos no fueron detectados CYP3A4\*1C y CYP3A4\*1D (Kuehl y cols., 2001).

La secuencia de cADN CYP3A5 fue descrita de forma independiente por Schuetz, (Aoyama y cols., 1989, Schuetz y cols., 1989). El alelo correspondiente a este cADN y la correspondiente proteína expresada fueron designados como el genotipo wild-type, CYP3A5\*1A. Las modificaciones encontradas en la región reguladora-5' correspondientes a CYP3A5\*1A, fueron notablemente menores comparadas con el gen CYP3A4 (Lamba y cols., 2002).

Cabe destacar las mutaciones en la sección intrónica de CYP3A5, donde se halla el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) más frecuente y funcionalmente importante, el cual consiste en un cambio de base A6986G dentro del intrón 3, representando los haplotipos CYP3A5\*3 (\*3A, \*3B y \*3C) (Kuehl y cols., 2001).

Según Hustert y cols, el genotipo CYP3A5\*3/\*3 es perfectamente concordante con niveles indetectables de proteína hepática CYP3A5 (Hustert y cols., 2001). Además, la homocigosis para el alelo CYP3A5\*3 está fuertemente asociada con un bajo contenido proteico CYP3A5 en hígado de afro-americanos y en la mucosa intestinal de caucásicos (Kuehl y cols., 2001).

Como puede observarse en la tabla III, la variante alélica CYP3A5\*3 (G6986) es común a todos los grupos étnicos estudiados, aunque se encuentre presente en diferentes frecuencias alélicas. En este caso, la variante alélica es más prevalente que el alelo wild type para la mayoría de las poblaciones. Centrándonos en el alelo funcional CYP3A5\*1 (A6986),

la frecuencia en caucásicos es del 5-15% y en afro-americanos del 45-73% (Hustert y cols., 2001, Kuehl y cols., 2001).

Hustert y col. también informaron acerca de la frecuencia alélica A6986 en un 27% en población china y un 30% en coreanos (Hustert y cols., 2001). Los datos disponibles sugieren la existencia de una gran diversidad genética étnica para el alelo CYP3A5\*1, lo cual puede tener importantes consecuencias clínicas.

Existen mutaciones en los intrones 4 y 5 del gen CYP3A5 que crean sitios críticos de corte pudiendo afectar a la producción de mRNA mensajero (Kuehl y cols., 2001). El alelo CYP3A5\*5, fue descrito por vez primera en la población china (Chou y cols., 2001), representa la mutación T12952C sobre la transcripción de RNAm y presumiblemente se traduce en un descenso en la expresión de la proteína CYP3A5.

CYP3A5\*7 representa una base de inserción en el exon 11 (27131-32 insertoT), dando como resultado una proteína truncada (Chou y cols., 2001, Hustert y cols., 2001).

Las variantes alélicas CYP3A5\*6 y CYP3A5\*7 ocurren a una relativamente baja frecuencia en caucásicos y chinos, pero son relativamente comunes entre afro-americanos (10-13%). Otros polimorfismos de CYP3A5 han sido descritos (Hustert y cols., 2001), aunque el haplotipo de estas mutaciones no ha sido todavía determinado.

Tabla III.- Variantes alélicas de CYP3A5

Alelos	Localización del nucleótido	Sustitución del amino ácido	Caucásicos	Afro-americanos	Otros	Refs.
CYP3A5*1A						(Aoyama y cols., 1989)
CYP3A5*1B	5' UTR G-86A		3%	0%		(Kuehl y cols., 2001)
CYP3A5*1C	5'UTR C-74T		3%	7%		(Hustert y cols., 2001, Kuehl y cols., 2001)
CYP3A5*1D	3'UTR C31611T					
CYP3A5*2	Exon 11 C27289A	T398N	1.9-5%	0%		(Hustert y cols., 2001, Jounaidi y cols., 1996)
CYP3A5*3A	Intron 3 A6986G C31611T	DEFECTO DE CORTE	70%	27-50%	Japoneses 71-85% Chinos 65-73% Coreanos 70% Mejicanos 75%	(Hustert y cols., 2001, Kuehl y cols., 2001)
CYP3A5*3B	Intron 3 A6986G C3705T	H30Y	95%	27%		(Hustert y cols., 2001)
CYP3A5*3C	Intron 3 A6986G	DEFECTO DE CORTE			Japoneses 71% Chinos 73% Coreanos 70%	(Hustert y cols., 2001)
CYP3A5*4	Exon 7 A14665G	Q200R			Chinos 0.9%	(Chou y cols., 2001)
CYP3A5*5	Intron 5 T12952C	DEFECTO DE CORTE			Chinos 0.9%	(Chou y cols., 2001)
CYP3A5*6	Exon 7 G14690A	DEFECTO DE CORTE	0%	13%	0%	(Hustert y cols., 2001, Kuehl y cols., 2001)
CYP3A5*7	Exon 11 27131 ins T	STOP CODON A 348	0%	10%	0%	(Hustert y cols., 2001)

\* URT: región no codificadora del gen.

### 2.3.- Efectos de la edad sobre la actividad CYP3A

Los citocromos P450 funcionales pueden detectarse tempranamente en el desarrollo del feto, aunque el metabolismo oxidativo se produce en menor grado que en edad postnatal. Los citocromos P450 fetales no han sido del todo caracterizados, sin embargo hay uno de ellos que se expresa exclusivamente en el feto: CYP3A7. Los recién nacidos catalizan eficientemente la mayoría de las reacciones de fase I, aunque la tasa de esas reacciones es generalmente más baja que en adultos. Los sistemas enzimáticos de la fase I y de la II empiezan a madurar gradualmente a partir de las 2 semanas de vida, con diferente desarrollo para cada enzima.

En los ancianos se produce un descenso en la capacidad metabólica del hígado debido a la disminución de la masa hepática, de la actividad enzimática, y del flujo hepático sanguíneo. Esta disminución está relacionada principalmente con el sistema de citocromo P450, mientras que vías metabólicas alternativas no se ven afectadas.

En este grupo poblacional se da un mayor número de patología múltiple (Mehta y Lopez, 1986), más incidencia de enfermedades crónicas, que han de ser tratadas con varios fármacos, lo que ocasiona interacciones medicamentosas y una mayor incidencia de efectos adversos (Cadieux, 1989, Nolan y O'Malley, 1989), relacionada también con cambios de tipo farmacocinético y farmacodinámico producidos a ciertas edades (Tsujimoto y cols., 1989).

CYP3A7 y CYP3A4 se han clasificado generalmente como las isoformas hepáticas mayoritarias en hígado fetal y adulto, respectivamente. La expresión de CYP3A5 es altamente variable, generalmente independiente de la edad, siendo dichas variaciones más frecuentes entre la población afro-americana. Los microsomas hepáticos fetales muestran unos niveles de proteína CYP3A7 extremadamente altos al igual que durante los primeros 6 meses tras el



nacimiento. En el caso de CYP3A4 ocurre justamente lo contrario, presenta niveles de expresión muy bajos en hígado fetal, sufriendo posteriormente un incremento, en la edad postnatal (Stevens y cols., 2003).

Por otro lado, algunos autores han encontrado descenso en la expresión y en la actividad de CYP3A en hígado maduro (Warrington y cols., 2004).

#### **2.4.- Diferencias sexuales**

Diversos estudios clínicos sobre la disminución en la oxidación de estrógenos y benzodiazepinas en mujeres con respecto a los hombres, sugiere que variaciones en el metabolismo relacionadas con el sexo también son importantes en la respuesta farmacológica y tóxica de ciertos fármacos.

Krecic-Shepard y cols (Krecic-Shepard y cols., 2000), en un estudio realizado con nifedipino, demostraron que los hombres presentaban un aclaramiento significativamente más bajo que las mujeres de dicho fármaco, otro estudio realizado con midazolam, también presentó un aclaramiento de un 20-40% mayor en las mujeres que en los hombres (Harris y cols., 1995). A pesar de ello, otros estudios no han hallado dichas diferencias en el metabolismo de fármacos mediado por CYP3A. Así pues, Lobo y cols, no observaron diferencias respecto al género en el metabolismo de nifedipino (Lobo y cols., 1986).

Lo que sí parece ser es que ciertos fármacos metabolizados por CYP3A, presentan diferencias respecto al sexo, lo cual podría tener su explicación, en el papel que CYP3A desempeña con respecto al metabolismo de las hormonas esteroideas incluyendo progesterona y testosterona, pudiendo ser dichas hormonas, las responsables del mecanismo regulador de la actividad y nivel de expresión de CYP3A.

El ciclo menstrual, es una potencial fuente de variabilidad en el metabolismo de fármacos entre mujeres jóvenes. Los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo menstrual, especialmente las variaciones de progesterona puede que contribuyan a las diferencias en la actividad de CYP3A.

Las diferencias en la actividad CYP3A respecto al género, pueden repercutir en la susceptibilidad individual de padecer efectos adversos a determinados fármacos. Sería necesario llevar a cabo futuras investigaciones, con el fin de clarificar los mecanismos que determinan diferencias de actividad y el efecto del ciclo menstrual sobre la actividad CYP3A.

## **2.5.- Efecto de la dieta**

La dieta humana es una compleja mezcla de macronutrientes (proteínas, grasas e hidratos de carbono), micronutrientes (vitaminas, minerales...) y sustancias no nutritivas introducidas en la dieta a veces, de forma accidental tales como pesticidas, micotoxinas, productos derivados de la pirolisis etc. La contribución de la dieta tanto a la variabilidad intra- e interindividual en la eliminación presistémica y el metabolismo, está ampliamente indefinida, especialmente desde el punto de vista cuantitativo y predictivo.

Las variaciones dietéticas en individuos que seleccionan su propia dieta son a menudo impredecibles, por lo cual, estudios para determinar los efectos de macro nutrientes tales como hidratos de carbono, grasas y proteínas sobre el metabolismo de fármacos, se llevan a cabo en sujetos sanos bajo control dietético. Se ha observado por ejemplo, que cambiando la dieta casera, por una dieta pobre en carbohidratos y rica en proteínas, se produce un aumento del aclaramiento de teofilina; por el contrario cambiando a una dieta

rica en carbohidratos y pobre en proteínas resulta un aclaramiento menor (Juan y cols., 1986, Kappas y cols., 1976).

El efecto de un alimento sobre la biodisponibilidad oral de medicamentos se ha reconocido como la mayor fuente potencial de variabilidad intra- e interindividual durante varias décadas. Tal interacción fármaco-alimento, está asociada con la liberación de fármaco y otros aspectos tales como el proceso de absorción y cambios en la motilidad intestinal (Welling, 1996).

El metabolismo de fármacos puede verse seriamente afectado también por otros componentes dentro de la dieta, tales como alimentos ahumados y carne a la brasa. Varios estudios con teofilina (Kappas y cols., 1978), cafeína (Kall y Clausen, 1995) y antipirina (Kappas y cols., 1978) se han llevado a cabo, con la obtención de la correspondiente reducción de los niveles en plasma. Dichos estudios demostraron que los alimentos a la brasa y ahumados no solo producían una inducción en la actividad CYP1A del epitelio intestinal sino también en el hígado.

Algunos compuestos de la dieta pueden estimular o inhibir al CYP3A4 *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, flavonoides o el zumo de pomelo que contiene naringina, naringerina y miristicina (Yang y cols., 1992).

## 2.6.- Zumo de pomelo

Otro elemento importante dentro de la dieta, de gran relevancia en las interacciones farmacológicas es el *zum de pomelo*. Su papel sobre el metabolismo fue descubierto en un estudio llevado a cabo en 1989, de felodipino y etanol, en el que se usaba zumo de pomelo para enmascarar el sabor del etanol (Bailey y cols., 1989). Estudios sucesivos confirmaron que el zumo de pomelo incrementaba de forma significativa la biodisponibilidad del felodipino. Desde entonces, ha pasado más de una década de investigaciones enfocadas en los componentes específicos de dicho zumo y las interacciones con los medicamentos (Kane y Lipsky, 2000). La mayoría de los estudios se han enfocado en fármacos que son sustratos CYP3A (tabla IV), precisamente por la localización en el epitelio intestinal de esta subfamilia, lo cual proporciona la inhibición metabólica justo después de la ingesta del zumo. Dicha interacción ocurre después de ingerir un vaso de aproximadamente 250 ml de zumo de pomelo a base de frutas concentradas (Edgar y cols., 1992). El mayor efecto sobre la biodisponibilidad oral se produce cuando se administra el fármaco a continuación del zumo en un período de 2 a 4 horas (Lundahl y cols., 1995).

La comparación de los efectos del zumo de pomelo sobre el perfil de concentración en plasma-tiempo tras la administración del fármaco por vía oral o intravenosa indica la magnitud del cambio dependiente de la vía de administración. Por ejemplo, el zumo de pomelo no tiene efecto sobre los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina (Ducharme y cols., 1995) o midazolam (Kupferschmidt y cols., 1995) tras la administración intravenosa, pero sin embargo, la biodisponibilidad oral de ambos fármacos sufre un marcado incremento (tabla IV). Tales estudios muestran una interacción predominantemente intestinal.

Las variaciones en la biodisponibilidad oral oscilan entre un 30 a un 150% aproximadamente, (tabla IV), por ello, cobra especial importancia la variabilidad en el aclaramiento intrínseco de ciertos fármacos así como la extensión de su metabolismo presistémico. Por ejemplo, en el caso de terfenadina, los niveles en plasma de fármaco inalterado son generalmente indetectables ( $<5$  ng/ml), lo cual indica que dicho fármaco presenta un elevado efecto de primer paso hepático (probablemente mayor al 95%), pero tras el consumo de zumo de pomelo, los niveles en plasma encontrados exceden 15 ng/ml, lo cual sugiere un aumento en la biodisponibilidad al doble (Benton y cols., 1996, Honig y cols., 1996). No es de extrañar que tales incrementos en los niveles de concentraciones plasmáticas de ciertos fármacos estén asociados a mayores efectos farmacológicos. Así, en un estudio realizado por Benton, se encontró un retraso en la repolarización cardíaca en pacientes que tomaban concomitantemente terfenadina con zumo de pomelo, comparados con aquellos pacientes que eran tratados con el antihistamínico acompañado de un vaso de agua (Benton y cols., 1996, Honig y cols., 1996).

De forma similar ocurría con felodipino, cuando el bloqueante de los canales de calcio era administrado con zumo de pomelo y no con agua (Lundahl y cols., 1995). Pero el efecto del zumo de pomelo apenas es reproducible de unos individuos a otros (Bailey y cols., 1995), existiendo una notable variabilidad interindividual; en algunos individuos apenas se aprecian cambios, mientras que en otros el incremento de la biodisponibilidad puede ser hasta de 5 veces (tabla IV). Una posible razón de tal variabilidad puede ser la diferencia sustancial de cantidad de CYP3A presente en el epitelio intestinal.

Cabría esperar un mayor efecto inhibitorio del zumo de pomelo en aquellos individuos con mayor actividad CYP3A, comparado con aquellos en los que la enzima no estuviera esencialmente presente o disponible para dicha interacción.

**Tabla IV.- Efectos del zumo de pomelo sobre la biodisponibilidad oral de fármacos cuyo metabolismo está principalmente mediado por CYP3A**

Fármaco	% incremento de la biodisponibilidad	Rango incremento	%	% incremento en C <sub>max</sub>	% cambio en semivida	Referencias
Ciclosporina	43	-16 a 200	%	17	21	(Yee y cols., 1995) (Ducharme y cols., 1995) (Proppe y cols., 1995) (Hollander y cols., 1995)
	60			62	29	
	34			22	27	
	8 7					
Estradiol	40			31		(Schubert y cols., 1994)
Felodipino	151	164 a 469			23	(Bailey y cols., 1991)
	82	83 a 280		147		
	86					(Edgar y cols., 1992)
	101			75	19	(Bailey y cols., 1993a)
	43					(Bailey y cols., 1995)
	93	5 a 435		145	6	(Lundahl y cols., 1995) (Bailey y cols., 1996)
				92	4	
				145	6	
Midazola	52	26 a 100		56	0	(Kupferschmidt y cols., 1995)
Nifedipino	35			13	10	(Bailey y cols., 1991)
	47			4		(Rashid y cols., 1993)
					42	
Nisoldipino	76				3	(Bailey y cols., 1993b)
Nitrendipino	38			40		(Bailey, 1992)
	125			99		(Soons y cols., 1991)
Triazolam	48			30	18	(Hukkinen y cols., 1995)

Sin embargo, la situación actual es probablemente más compleja, por no obtener los resultados esperados (Bailey y cols., 1995, Bailey y cols., 1993a). De hecho, la propia variabilidad inter-sujetos no permanece constante, sino que puede realmente verse incrementada.

La característica común de los fármacos investigados con zumo de pomelo, es que presentan un elevado efecto de primer paso tras la administración oral, y su metabolismo es predominantemente mediado por la actividad CYP3A. Sin embargo, algunos datos parecen indicar que dicha interacción no es exclusiva de esta isoforma, ya que por ejemplo, el metabolismo de 7-hidroxilación de cumarinas mediado por CYP2A6 y la respectiva eliminación en orina, son significativamente reducidos a las 3-4 horas tras la administración concomitante de cumarina y zumo de pomelo (Merkel y cols., 1994). De forma similar, el zumo de pomelo reduce notablemente el aclaramiento oral de cafeína un 23% y prolonga su semivida un 31%, indicando la inhibición de CYP1A2 (Fuhr y cols., 1993). Por el contrario, la disposición de teofilina cuyo metabolismo también es mediado por CYP1A2, no se ve alterado por el uso concomitante de zumo de pomelo (Fuhr y cols., 1995); la razón de esta discordancia no está actualmente clara.

Finalmente, es posible que otros compuestos presentes sean los reponsables de la reducción de la actividad CYP producida por zumo de pomelo. Referente a esto, 6', 7' - dihidrobergamota, ha sido recientemente identificada como un posible inhibidor, (Edwards y cols., 1996, Edwards y Bernier, 1996). La capacidad del zumo de pomelo de reducir rápida y significativamente los niveles de proteína CYP3A en el epitelio intestinal (Lown y cols., 1997), sugiere la existencia de otros mecanismos aparte de la inhibición del enzima, que también puedan contribuir al efecto total.

Aunque el zumo de pomelo, claramente incrementa la biodisponibilidad oral reduciendo la actividad CYP3A, especialmente en el epitelio intestinal, la relevancia clínica de su conocimiento radica en evitar tal interacción con el fin de limitar efectos indeseables relacionados con el aumento de la concentración de ciertos fármacos. En un futuro, se podrían ajustar dosis de fármacos especialmente caros con zumo de pomelo, claro está que dicha posibilidad ha de ser demostrada contando siempre con la variabilidad interindividual.

## **2.7.- Implicaciones clínicas del polimorfismo de CYP3A**

La elevada variabilidad CYP3A, pudiera tener una base genética, sin embargo la importancia clínica de las variantes encontradas (CYP3A4\*1B y CYP3A5\*3 principalmente), está todavía por demostrar de forma consistente, como queda demostrado en un reciente estudio donde no se encuentra una correlación significativa entre los diferentes genotipos y el genotipo total de CYP3A (Floyd y cols., 2003).

Usando el alelo CYP3A4\*1B como marcador, varios estudios han implicado CYP3A4 como gen influyente en varias enfermedades incluyendo cáncer de próstata y leucemia secundaria inducida tras el tratamiento con epipodofilotoxina (Felix y cols., 1998, Paris y cols., 1999, Rebbeck y cols., 1998). Aunque originalmente se habló de la asociación del alelo CYP3A4\*1B con la alteración de la actividad hepática CYP3A4 (Amirimani y cols., 1999, Ando y cols., 1999), dicha asociación tiene sus controversias (Ball y cols., 1999, Westlind y cols., 1999).

La falta de evidencia en la confirmación de los datos in vivo, de la asociación genotípica del polimorfismo de CYP3A4\*1B y riesgo de enfermedad, sugiere la posibilidad de desequilibrio entre CYP3A4\*1B y otra mutación genética que es la verdadera causa del



fenotipo clínico. Un posible candidato para este papel podría ser CYP3A5, que debido a presencia en distintos órganos, se piensa que puede tener una función fisiológica, no solo catalítica, importante en éstos. Por ejemplo, CYP3A5 puede mediar el metabolismo de cortisol a 6 $\beta$ -hidroxicortisol, un regulador fisiológico del transporte de Na<sup>+</sup> en el epitelio renal (Grogan y cols., 1990). El polimorfismo en la expresión renal de CYP3A5 (Haehner y cols., 1996, Schuetz y cols., 1992), podría contribuir a las diferencias interindividuales en la producción localizada de 6 $\beta$ -hidroxicortisol dentro de la nefrona, y podría jugar un papel en la etiología, por ejemplo, de la hipertensión sensitiva a la sal por el incremento de la retención renal de Na<sup>+</sup>.

Es importante destacar que la hipertensión de origen renal, sodio-dependiente, es más prevalente en afro-americanos que en caucásicos americanos, al igual que el alelo CYP3A5\*1.

La expresión polimórfica de CYP3A5 podría también contribuir a un metabolismo variable de esteroides en próstata y mama, repercutiendo en diferencias en las concentraciones de esteroides circulantes, con el consecuente riesgo de enfermedad de los tejidos. Por ejemplo, CYP3A4 y CYP3A5 metabolizan estrona (Lee y cols., 2002) y 17 $\beta$ -estradiol (Lee y cols., 2001) a catecol-estrogenos y estrógenos hidroxilados respectivamente (Huang y cols., 1998), y todo ello está implicado en la carcinogenicidad mediada por estrógenos. CYP3A5 presenta una regioespecificidad por el producto diferente de CYP3A4, con una mayor preferencia por la formación de 4-hidroxiestrógenos. Dicha regioespecificidad contribuye al variable metabolismo de esteroides en próstata y mama, con las respectivas implicaciones clínicas.

Kuehl y cols. establecieron la hipótesis de que los alelos CYP3A4\*1B y CYP3A5\*1 pueden estar presentes en la misma persona, y que CYP3A5\*1 puede que influya en la actividad funcional sistémica o local CYP3A, tanto de sustratos endógenos como exógenos (Kuehl y cols., 2001).

La simultánea presencia de los alelos CYP3A4\*1B y CYP3A5\*1 en los mismos individuos afro-americanos, sugiere la necesidad de reevaluar esta asociación y determinar tanto si el alelo CYP3A5\*1, como la expresión CYP3A5, pudieran estar más íntimamente ligadas al riesgo de enfermedades. Por ejemplo, la interpretación del hallazgo de que las personas que no expresaban la proteína CYP3A5, desarrollaban leucemia mieloide aguda (AML) secundaria al tratamiento con epipodofilotoxina, es debido a que la expresión de CYP3A5 aumenta el aclaramiento de este agente leucémico. También, la asociación entre el alelo CYP3A4\*1B y el riesgo de cáncer de próstata en afro-americanos, podría ser debido a la formación de moléculas mutagénicas catalizadas por el alelo CYP3A5\*1.

### 3.- FARMACOGENÉTICA DE LOS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

---

La glicoproteína P (P-gp) humana es una proteína transportadora de membrana, que se comporta como una bomba transportadora de sustratos, desplazando los fármacos desde el espacio intracelular hasta el espacio extracelular.

P-gp se localiza en la superficie canalicular de los hepatocitos, en el extremo proximal de las células tubulares del riñón, y en la superficie de los enterocitos, en las vellosidades intestinales (Thiebaut y cols., 1987). P-gp también se localiza en la barrera hematoencefálica, en placenta, ovarios y testículos (Cordon-Cardo y cols., 1989). La hidrólisis del ATP proporciona la energía necesaria para activar el transporte de fármacos, capacitando al transportador para actuar frente al gradiente de concentración.

Así pues, la localización anatómica de P-gp, sugiere que este transportador actúe como barrera de protección ante toxinas externas al organismo, mediante la excreción de estos compuestos en bilis, orina o lumen intestinal, evitando así una acumulación de tales compuestos en órganos críticos tales como cerebro, gónadas y médula ósea, así como en el feto.

P-gp tiene la capacidad de transportar una gran variedad de agentes farmacológicamente diferentes, empleados en terapia anticancerosa, hipertensión, alergia, infecciones, inmunosupresión, enfermedades neurológicas y en inflamación. Es evidente, que muchos de estos sustratos de P-gp son también sustratos de enzimas, en concreto de CYP3A4. Dada la especificidad de sustratos de ambas proteínas, parece ser que exista un mecanismo regulador entre ambas, para evitar la presencia y acumulación de ciertos compuestos en el organismo. Pero dicho mecanismo aún no está claro, debido a que hay ciertos sustratos de CYP3A4 (p. ej. midazolam) que no son transportados por P-gp (Kim y cols., 1999) y por el

contrario, digoxina, fexofenadina y talinolol son sustratos de P-gp que no interaccionan con las enzimas CYP incluyendo CYP3A4.

Dada la elevada importancia de P-gp en el metabolismo y respuesta de fármacos, no es extraño, el creciente interés que cobra el gen MDR1 (gen que codifica a la glicoproteína P-gp), debido al gran número de polimorfismos en un solo nucleótido (SNPs) identificados en MDR1 hasta el momento. Un creciente número de estudios han relacionado, los SNPs en MDR1 con problemas asociados a la variación en los niveles de algunos fármacos y la susceptibilidad de ciertos individuos a padecer enfermedades tales como Parkinson o inflamación intestinal. Sin embargo, en muchos casos, los efectos de los polimorfismos de MDR1 no presentan consistencia y en otros casos, son conflictivos. Es importante añadir que deberían considerarse los haplotipos, factores ambientales y el diseño de los estudios para evitar posibles confusiones con respecto a los efectos in vivo de los polimorfismos presentes en MDR1.

#### 4.- EBASTINA COMO PRUEBA METABÓLICA

---

Las enzimas CYP3A muestran un alto grado de variabilidad interindividual, esto, puede ser debido en parte a su expresión polimórfica. Los mecanismos implicados en la inducción de estas enzimas son poco conocidos, existiendo la posibilidad de un polimorfismo inducible (es decir, un polimorfismo que afecta a los genes implicados en el proceso de inducción). Con enzimas inducibles y aparentemente monomórficas, sólo las técnicas de fenotipación pueden dar alguna información del estatus metabólico. No obstante, los factores que controlan la inducción de la enzima, incluyendo factores medioambientales, pueden variar con el tiempo. Así, la predicción de la capacidad metabólica para fármacos metabolizados por enzimas inducibles sólo es válida para un corto período de tiempo tras los análisis de fenotipación.

El empleo de la fenotipación para determinar la actividad de enzimas que metabolizan fármacos o xenobióticos en general, conlleva el desarrollo de métodos específicos para medir la actividad de enzimas in vivo (fenotipación), pudiendo aportar importantes pistas para la valoración de los procesos metabólicos.

La fenotipación enzimática se realiza mediante la administración de una “sustancia prueba” que posee una vía de biotransformación particular, la cual se demuestra (normalmente por experimentos in vitro) que es llevada a cabo por la enzima en cuestión. Dependiendo de la importancia cuantitativa de este paso metabólico, se usan parámetros farmacocinéticos específicos o ratios metabólicos específicos en diferentes fluidos biológicos para valorar la función enzimática in vivo.

Sin embargo, muchos factores pueden afectar adversamente la capacidad de un parámetro para predecir con precisión la actividad de un enzima específico, incluyendo:

- 1.- El potencial para eliminar fármacos o formar metabolitos específicos que tienen múltiples isoformas enzimáticas con el solapamiento de selectividades por un sustrato.
- 2.- La existencia de complejos patrones de competitividad o vías secuenciales de biotransformación, las cuales variarán con la dosificación del fármaco de acuerdo con las constantes cinéticas enzimáticas, que son únicas para cada vía.
- 3.- Variaciones debidas a factores no metabólicos (especialmente en ratios metabólicos urinarios), como procesos de excrección renal.

La necesidad de encontrar una sustancia prueba para CYP3A se debe a tres razones fundamentales, que son en primer lugar, la baja biodisponibilidad oral que presentan los sustratos de CYP3A debido al extenso efecto de primer paso a nivel intestinal que sufren dichos sustratos, en segundo lugar, los sustratos de CYP3A son susceptibles a interacciones debido a que los enzimas CYP3A son altamente inducibles o inhibibles por ciertos fármacos, y por último, cabe destacar la importancia de la búsqueda de una prueba eficaz debido a la gran variabilidad inter-individual en cuanto al contenido y actividad enzimática que presentan las enzimas CYP3A tanto en hígado como en intestino.

Por todo ello, hasta el momento, se han propuesto varias pruebas basadas en ensayos para medir la actividad CYP3A (eritromicina, midazolam, cortisol, nifedipina, dapsona), que son pruebas relativamente seguras, pero todas ellas presentan algunas desventajas en cuanto a su inocuidad, vía de administración y posibles efectos adversos

Nuestra intención en primer lugar fue conseguir una sustancia prueba, de carácter inócuo con el fin de poder ser administrada a los voluntarios sanos, de forma sencilla e inofensiva. Para ello, nos basamos en un estudio realizado por Hashizume y cols, mediante el cual, determinaron las rutas metabólicas para ebastina (un antihistamínico de segunda

generación), siendo una de ellas, mediada por CYP3A, con lo cual, consideramos la posibilidad de obtener una prueba eficaz para dicho citocromo (Hashizume y cols., 1998).

Los antihistamínicos H<sub>1</sub> son los fármacos más ampliamente usados de todas las medicaciones (Kaufman y cols., 2002). Aunque presentan una eficacia similar en el tratamiento de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica, urticaria y otras enfermedades alérgicas, todos ellos presentan diferencias en cuanto a la estructura química, la farmacología clínica, y su potencial toxicidad (Simons y Simons, 1994).

Se clasifican generalmente en dos categorías, antihistamínicos clásicos (cuyas características sedativas son bien conocidas en clínica), y antihistamínicos de segunda generación (acrivastatina, cetirizina, desloratadina, *ebastina*, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina). La sedación es provocada por su penetración en el sistema nervioso central (SNC) a través de la barrera hematoencefálica, con la consecuente ocupación de los receptores H<sub>1</sub> de la histamina (Goldberg y cols., 1987). Diversos autores, entre ellos Tagawa y cols. (Tagawa y cols., 2001), han observado que los agentes antihistamínicos de segunda generación producen una ocupación del receptor H<sub>1</sub> relativamente más baja que la de aquellos antihistamínicos sedantes.

Ebastina es un antihistamínico de segunda generación, eficaz en rinitis alérgica (Baba S, 1994, de Molina M, 1989, Gehannol P, , Luria, 1999, Picado VC, 1991) y urticaria (Kalis B, 1995, Peyri J, 1991).

Ebastina (4'-tert-butyl-4[4-(difenilmetoxi)piperidino] butirofenona, (EBT), se une preferentemente a los receptores periféricos H<sub>1</sub> in vivo (Wiseman y Faulds, 1996).

En farmacología experimental y en investigaciones clínicas preliminares, éste fármaco parece ser un potente antihistamínico de larga duración de acción, y propiedades

aparentemente no sedativas (Roberts y cols., 1987). Tras la administración oral en animales de experimentación y en humanos, EBT se metaboliza casi por completo en su principio farmacológicamente activo, carebastina, y otros metabolitos inactivos (Fujii y cols., 1994, Matsuda y cols., 1994, Yamaguchi y cols., 1994).

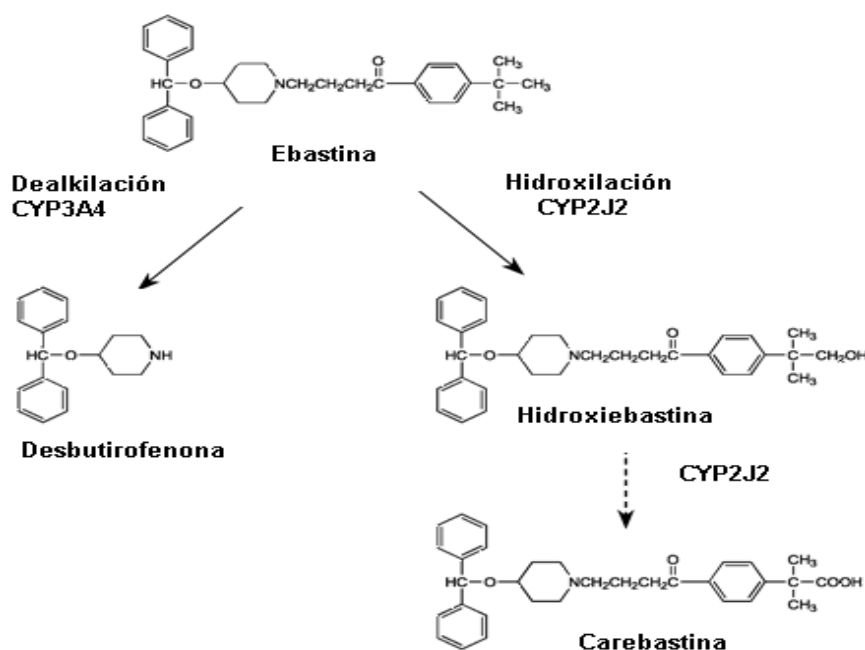
Carebastina es el metabolito mayoritario detectado en sangre y en orina, mientras que el fármaco inalterado EBT, apenas ha sido detectado hasta el momento en dichos fluidos (Matsuda y cols., 1994, Yamaguchi y cols., 1994). Estudios anteriores realizados con ratas, indicaron que EBT, tras una administración oral, sufría un elevado efecto de primer paso intestinal, dando lugar a carebastina, su mayor metabolito detectable en sangre, mediante una hidroxilación de EBT y otros metabolitos inactivos, tales como hidroxiebastina y desalkyl-ebastina (Fujii y cols., 1997). Así pues, es probable que el intestino delgado juegue un papel importante en el metabolismo de primer paso de este fármaco. De hecho, varias enzimas responsables del metabolismo de EBT existen en este tejido: se piensa que CYP3A4 media la N-dealkylación para dar lugar a un metabolito llamado desbutirofenona (Hashizume y cols., 1998), mientras que la oxidación de ebastina para dar hidroxiebastina, conduciendo a la formación de carebastina, parece estar mediada por otras enzimas diferentes a CYP3A, probablemente CYP2J2 y CYP4F12 (Hashizume y cols., 2002, Hashizume y cols., 2001). (figura 5).

CYP2J2 es el único miembro de la subfamilia CYP2J en humanos (Ma y cols., 1998, Wu y cols., 1996). Este gen se expresa en grandes cantidades en corazón, especialmente en células endoteliales de las arterias coronarias (Node y cols., 1999, Wu y cols., 1996), pero también se encuentra en otros tejidos tales como hígado, riñón, pulmón, páncreas y tracto gastrointestinal (Ding y Kaminsky, 2003, Lindell y cols., 2003, Wu y cols., 1996, Zeldin y cols., 1997a, Zeldin y cols., 1997b, Zeldin y cols., 1996). CYP2J2, junto con otras enzimas,



está involucrado en la biotransformación de ácido araquidónico a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y otras sustancias relacionadas, siendo una ruta diferente a la clásica ruta del ácido araquidónico dando lugar a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Zeldin, 2001). La contribución del CYP2J2 al metabolismo de xenobióticos se desconocía, hasta que de forma reciente, varios estudios han confirmado la participación de CYP2J2 en el metabolismo de algunos compuestos tales como diclofenaco, bufuralol o ebastina (Hashizume y cols., 2002, Wu y cols., 1996).

**Figura 5.- Rutas metabólicas propuestas para ebastina**



Ebastina es un sustrato de la glicoproteína P (Pg-p), de tal modo, que a altas concentraciones puede comportarse como un inhibidor de la misma. Sin embargo, según

Imamura, la inhibición de P-gp, por parte de ebastina es poco probable, ya que se necesitarían concentraciones muy elevadas de fármaco (superiores a 50  $\mu\text{M}$ ) presentes en el lumen intestinal, cantidades que no se alcanzan en humanos tras la administración oral de dosis clínicas (Imamura y cols., 2001).

Parece bastante improbable que el flujo mediado por P-gp, afecte de forma dramática al balance global de la absorción intestinal de ebastina in vivo, debido a la eficiente difusión pasiva del fármaco por ser altamente lipofílico. Sin embargo, el transporte de ebastina mediado por P-gp, tiene un efecto ventajoso, dando lugar al elevado efecto de primer paso producido durante la absorción dando lugar al metabolito activo carebastina, evitándose así, mayor absorción del fármaco parental y los posibles efectos adversos del mismo.

#### **4.1.- Farmacocinética de ebastina**

Ebastina, tras la administración oral, sufre un elevado efecto de primer paso, presentando una farmacocinética altamente variable (Rohatagi y cols., 2001).

Los estudios farmacocinéticos tradicionales proporcionan información sobre biodisponibilidad, volumen de distribución, unión a proteínas, semi-vida de eliminación, aclaramiento e interacciones farmacológicas.

La biodisponibilidad sistémica de un antihistamínico  $H_1$  se refiere a la fracción total de dosis absorbida. Tras la administración oral, los antihistamínicos  $H_1$  son generalmente bien absorbidos, alcanzando concentraciones máximas en plasma en el rango de 1 a 3 horas tras la ingesta de alimentos (Simons y Simons, 2002), (tabla V).

La biodisponibilidad se ve influida por los distintos transportadores de fármacos, incluyendo la proteína transportadora de aniones orgánicos y la glicoproteína P (Pg-P).

El volumen de distribución es un factor proporcional, que relaciona la concentración del antihistamínico  $H_1$  en plasma con la cantidad total corporal del mismo, por lo tanto, cuanto mayor es el grado de distribución tisular y unión a proteínas, menor es la concentración en plasma y mayor es el volumen de distribución. El volumen de distribución de los antihistamínicos  $H_1$  medido farmacocinéticamente, varía hasta 100 veces, variando desde 0.33 l/Kg para levocetiricina a 90-123 l/Kg para ebastina, muchos antihistamínicos  $H_1$  parecen distribuirse de forma extensa en los tejidos corporales (Mycek MJ, 2002, Simons y Simons, 2002) (tabla V).

Ebastina presenta una unión a proteínas plasmáticas en un porcentaje  $>95\%$  (Mycek MJ, 2002, Simons y Simons, 2002).

La semivida de eliminación hace referencia al tiempo que tarda en descender en un 50% la cantidad de fármaco con respecto a la dosis inicial. La semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ), depende del volumen de distribución y del aclaramiento del fármaco, que para ebastina oscila entre 10-19 horas.

El aclaramiento es una medida de la eliminación, que determina la fracción del volumen de un fluido corporal (p.ej plasma) que es completamente libre de antihistamínico  $H_1$  en un período de tiempo determinado, con lo cual se expresa en volumen /tiempo.

El aclaramiento total del antihistamínico sería la suma del aclaramiento de todos los órganos, incluyendo el aclaramiento renal y hepático (Mycek MJ, 2002, Simons y Simons, 2002).

**Ebastina** es metabolizada en gran parte por el sistema enzimático P450 (CYP450). Parte del fármaco se elimina como tal, inalterado, en heces y orina.

**Tabla V.- Farmacocinética y farmacodinamia de los antihistamínicos H<sub>1</sub>.**

Fármaco	T <sub>max</sub> (hr)	T <sub>1/2β</sub>	V <sub>d</sub> (L/Kg)	Unión proteínas %	a	Duración de acción (horas)	Población donde se requiere ajustar la dosis
Acrivastatina	1,4±0,4	1,4-3,1	0,64	50		8	Ninguna
Cetirizina	1,0±0,5	6,5-10	0,56	93		≥24	Disfunción hepática o renal
Desloratadina	3	27	–	–		≥24	Ninguna
<b>Ebastina</b>	(2,6-5,7)	(10,3-19,3)	(90-123)	>95		≥24	Disfunción hepática o renal
Fexofenadina	1-3	14,4	5,8±0,7	60-70		24	Disfunción renal
Levocetirizina	0,8±0,5	7±1,5	0,33	96		>24	Disfunción hepática o renal
Loratadina	1,2±0,3	7,8±4,2	119	98		24	Disfunción hepática
Mizolastina	1,5	12,9	1,4	98		24	Ninguna

El objetivo que se persigue con los estudios farmacocinéticos es poder ajustar la dosis, especialmente en aquellos pacientes con problemas de disfunción hepática o renal, así como establecer la dosis adecuada para los distintos grupos de individuos de diferentes edades, sexo, raza, etc.

# **OBJETIVOS**

Los objetivos iniciales que han motivado la realización de este estudio han sido los siguientes:

1. Optimización de una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), acoplada a un espectrómetro de masas para la detección y cuantificación de ebastina y sus principales metabolitos desbutirofenona, carebastina e hidroxiebastina en orina.
2. Desarrollo y optimización de diversas técnicas de biología molecular, con el fin de poder genotipar una población de voluntarios sanos en relación con los citocromos P450 CYP3A y CYP2J2.
3. Determinación del metabolismo de ebastina a través del análisis urinario de este compuesto y sus metabolitos en dicha población. Se analizarán las diferencias metabólicas interindividuales en relación con factores constitucionales (sexo) y factores ambientales (consumo de zumo de pomelo, hábito tabáquico).
4. Estudio de correlación entre los polimorfismos genéticos CYP3A y CYP2J2 y el metabolismo de ebastina en la población objeto de estudio.

# **MATERIAL Y MÉTODO**

## **1.- INSTRUMENTAL Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS DE GENOTIPACIÓN DE LOS CITOCROMOS CYP3A Y CYP2J2**

---

Para el desarrollo de las técnicas de genotipación de CYP3A4 y CYP3A5 fue necesario emplear los siguientes reactivos e instrumentos respectivamente:

### **1.1.- Reactivos**

- Oligonucleótidos, dNTPs (Invitrogen S.A., Barcelona, España), MgCl<sub>2</sub>, Ecotaq (Ecogen, Ecogen S.R.L., Barcelona, España), Tampón 10x de reacción (Ecogen), bromuro de etidio (Sigma Aldrich), endonucleasas de restricción MboII (CYP3A4) y Ssp I, Dde I (CYP3A5), (New England Biolabs, Beverly, MA).

### **1.2.- Equipamiento**

- Aparato de electroforesis submarina (Ecogen), Termociclador PTC-200 (Peltier Ternal Cycler), Transiluminador Gelprinter Plus asistido por un software Scion Image para Windows (Scion Corporation 2000).

### **1.3.- Técnicas de genotipación de CYP2J2**

#### **1.3.1.- Reactivos**

- Oligonucleótidos, dNTPs (Invitrogen S.A., Barcelona, España), MgCl<sub>2</sub>, Ecotaq (Ecogen, Ecogen S.R.L., Barcelona, España), Tampón 10x de reacción (Ecogen), bromuro de etidio (Sigma Aldrich), endonucleasas de restricción Tse I, Hga I, y Nfe I (New England Biolabs, Beverly, MA). Los instrumentales empleados para genotipación son los mismos empleados en el apartado anterior (1.2).



## **2.- INSTRUMENTAL Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE EBASTINA Y METABOLITOS EN ORINA:**

---

Los compuestos y equipos empleados en la determinación metabólica de ebastina fueron los siguientes:

### **2.1.- Compuestos de referencia**

- Desbutirofenona, carebastina, hidroxibastina y ebastina, fueron cedidas por Almirall-Prodesfarma (Barcelona, España).
- Dihidrocloruro de flunarizina, empleada como estándar interno (IS), fue suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España).
- Zumo de pomelo 100% a base de zumo concentrado (El corte Inglés®, preparado por Juver Alimentación, Murcia, España).

### **2.2.- Reactivos**

- Metanol, ácido acético, hidrogeno fosfato sódico, ácido ortofosfórico y acetato amónico, Merck, Darmstadt (Alemania).
- Nitrógeno C-50, Carburos metálicos (Barcelona).
- Agua desionizada, para la constitución de las soluciones y fases móviles, filtrada en un sistema Milli Q, Millipore Ibérica, S.A. (Madrid).

### **2.3.- Cromatografía**

Para el análisis fue utilizado un sistema de serie 1100 Hewlett-Packard (HP). (Agilent Technologies España S.L; Madrid). El modelo estaba formado por:

- Un degasificador automático (modelo G1322A).

- Una bomba cuaternaria (modelo G1311A).
- Auto inyector (modelo G1313A).
- Termostato (modelo G1316A).
- Detector ultravioleta / visible (UVA) de barrido (“diodo Array”), (modelo G1315A).
- Un espectrómetro de masas constituido por un cuadrupolo (modelo G 1946A) equipado con una fuente de ionización de electro spray (ESI).
- Un detector de fluorescencia (modelo G1321A).
- Un ordenador asistido por una Chemstation HP G2710AA LC/MS (Agilent Technologies, España, SL, Madrid, España) fue usado para control de los instrumentos y manejo de datos. Columna Ultrasphere ODS (750mm x 4,6 mm ID (diámetro interno), tamaño de partícula 5 µm; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).
- Fase móvil, compuesta por acetonitrilo/ buffer acetato amónico 0,012M (52:48, v/v).

El tampón acetato amónico 0,012M se preparó disolviendo 1 g de acetato amónico y 10 ml ácido acético en 1040 ml de agua destilada. La fase móvil se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Millipore Corporate Headquarters, Billerica, MA, USA) y desgasificó posteriormente mediante ultrasonidos durante 15 minutos.

Se usó un sistema isocrático (sin variación de los componentes de la fase móvil durante la separación cromatográfica), en fase reversa (los componentes de la fase estacionaria o columna son apolares, y los de la fase móvil polares). El flujo y la longitud de onda usados fueron de 0,5 ml/min y 254 nm respectivamente. La temperatura de la columna fue mantenida a 40° C.

Se analizaron los siguientes compuestos: **desbutirofenona, carebastina, hidroxiebastina y ebastina.**

#### 2.4. – Espectrometría de Masas

Los compuestos fueron ionizados en una fuente de ionización de electro spray (ESI<sup>+</sup>) modo positivo en el espectrómetro de masas. Se utilizó el modo de monitorización selectiva de masa atómica, modo (SIM) para la cuantificación de los iones protonados de cada analito.

Las condiciones de detección fueron las siguientes: se suministró nitrógeno como gas de secado a un flujo de 10 l/min a una temperatura de 330°C. El eluyente del HPLC se introdujo en la fuente mediante la interfase de electro spray, generando los iones pseudomoleculares cargados positivamente  $[M+H]^+$ . El voltaje del capilar se ajustó a 4000 V. Para establecer las condiciones SIM apropiadas, se recogió el espectro completo en modo scan de ebastina (EBT), sus metabolitos y flunarizina (IS) en el rango de unidades de masa atómica (amu) de 220-550, a diferentes voltajes de fragmentador (rango, 55-180V). Tras la fragmentación observada, se eligió el fragmentador a 55V para la detección en SIM de desbutirofenona y el voltaje de 105V para la detección de ebastina, carebastina, hidroxiebastina y el IS.

### **3.-DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS**

---

#### **3.1.-Técnicas de genotipación de CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2**

Las variantes alélicas del CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 se determinaron por PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo, en teoría de una única copia de ese fragmento. Esta técnica sirve para amplificar el ADN. Tras la amplificación, resulta mucho más sencillo investigar sobre el ADN amplificado. Ésta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, y usa ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Para que ésta técnica funcione es necesario abundante suministro de bases de nucleótidos y dos *cebadores*, que son secuencias cortas de unos 20 nucleótidos y que se usan para iniciar la reacción (PCR). En primer lugar se calienta la mezcla para separar las hebras de ADN (el ADN se abre) y a continuación se enfría la solución, lo que permite que los *cebadores* se peguen a las partes adecuadas de la hebra de ADN (chocan unas a otras hasta que encuentran el complemento exacto, y entonces se ensamblan, actuando como límites de la región de la molécula que va a ser duplicada). Para terminar, se aumenta la temperatura hasta el valor en que puede actuar la **polimerasa**, y sobre la plantilla crece una hebra nueva complementaria.

El polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), se basa en la detección de los fragmentos de ADN de distinto peso molecular (por digestión de la misma enzima de restricción).

Previa a la reacción en cadena de la polimerasa, se produjo la extracción del ADN genómico como sigue a continuación.

### ***3.1.1.- Purificación de ADN genómico***

Se tomó una muestra de 7 ml de sangre de los 102 voluntarios y posteriormente se aisló el ADN de los leucocitos sanguíneos periféricos en cada sujeto a partir de muestras de sangre de 2 ml empleando para ello el Kit Qiagen® blood midi kit (Quiagen Inc., Chatsworth, CA), siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se pipetea 200 µl de Proteasa QIAGEN en el fondo de un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Se añaden a continuación 2 ml de sangre y se mezclan con cuidado.
3. Añadimos 2,4 ml de un tampón llamado AL (tampón de lavado) y agitamos la mezcla al menos 3 veces, durante 5 segundos cada vez.
4. La mezcla es incubada a 70°C durante 10 min.
5. Añadimos 2 ml de etanol (96-100%) a la muestra y se mezcla de nuevo agitando.
6. Con mucho cuidado, se transfiere la mitad de la solución anterior (3,3 ml) sobre unas columnas proporcionadas por el Kit (QIAamp Midi columnas), dichas columnas se sitúan sobre los tubos de centrifuga de 15 ml evitando siempre tocar la pieza final del filtro de la columna con la sangre. Se procede al cierre de la tapadera y se centrifuga a 1850g (3000rpm) durante 3 min.

7. Se retira la columna QIAamp Midi, descartando el filtrado, y se coloca de nuevo la columna sobre el tubo de centrifugación de 15 ml. Se recarga la solución restante procedente del paso 5 y se centrifuga de nuevo a 1850g (3000rpm) durante 3 min.
8. Se retira la columna QIAamp Midi, descartando el filtrado, colocándola sobre un tubo de centrífuga de 15 ml.
9. Cuidadosamente, se añaden 2 ml de tampón **AW1** (lavado) sobre la columna QIAamp Midi. Se cierra la tapa y se centrifuga a 4500g (5000rpm) durante 1 min.
10. Se añaden posteriormente otros 2 ml de tampón **AW2** (lavado) a la columna y se procede a la centrifugación a 4500g (5000rpm) durante 15 min.
11. Se lleva la columna QIAamp sobre un tubo de centrifugación de 15 ml, descartando el tubo anterior con el filtrado.
12. Se añaden 300 µl de un tampón AE (lavado) o agua destilada, a temperatura ambiente (15-25°C). Se pipetea directamente sobre la membrana de la columna cerrándose después, pasando a incubar a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugando después a 4500g (5000rpm) durante 5 min.
13. El eluato final contiene la muestra de ADN purificado que nos interesaba obtener.
14. Se conservó el ADN genómico en viales estériles de plástico a 4°C hasta su posterior análisis.

### ***3.1.2.- Genotipación del CYP3A4***

Se llevó a cabo el estudio del polimorfismo en la región promotora 5' del gen CYP3A4 humano, en el se trató de evaluar la influencia del genotipo CYP3A sobre el metabolismo de ebastina y al mismo tiempo determinar la presencia de la variante alélica

CYP3A4\*1B (mutación que suele estar presente en la población caucásica entorno a un 4-10%).

Dicho trabajo, se basó en el estudio de Cavalli y cols., (Cavalli y cols., 2001) añadiendo al método, algunas modificaciones. El análisis de la mutación CYP3A4\*1B, se realiza como se describe a continuación:

Los oligonucleótidos (5'-GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA-3') y (5'-CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG-3') se crean basados en una secuencia publicada [GenBank Acceso No. D11131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)]. El oligonucleótido 5'-3' se diseñó generando un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *MboII*, de tal manera que cuando la base es una adenina (A; wild type), este sitio de reconocimiento para el enzima de restricción desaparece si la base es una guanina (G; mutado).

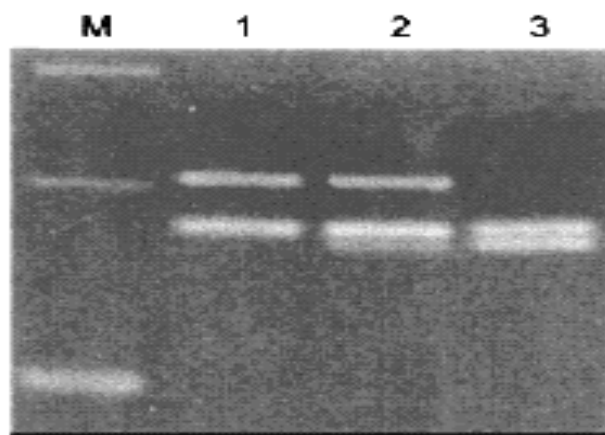
Las reacciones de PCR para el alelo CYP3A4\*1B fueron realizadas en un volumen total de 50 µl, para ello se utilizaron ≈50 ng de ADN genómico, 40 pmol de oligonucleótidos, 200 µM dNTPs (Invitrogen, Invitrogen S.A., Barcelona, España), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de *Ecotaq* (Ecogen, Ecogen S.R.L., Barcelona, España) y tampón 10X de reacción [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl y 0,1% Tween-20 (Ecogen)]. Los ciclos para la amplificación de los alelos se comenzaron con una desnaturalización inicial de 95°C durante 7 min, seguido de 40 ciclos en los que se incluía una desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 64°C durante 15 s y una extensión a 72°C durante 30 s. Después de la finalización de los ciclos, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 min.

Alícuotas de 5 µl de cada producto de PCR fueron digeridas con la endonucleasa *MboII* 5U (New England Biolabs, Beverly, MA) en un volumen total de reacción de 10 µl ,

incubándose posteriormente la mezcla de reacción a 37°C, no más de 1 hora por posible pérdida de la actividad del enzima de restricción. Los fragmentos de la digestión fueron separados por electroforesis durante 2 horas a 150 V/h en geles de agarosa al 3%, teñidos con 20 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), siendo posteriormente visualizados en un transiluminador de luz UV.

El producto amplificado tiene un tamaño de 385 pb con dos sitios de corte, uno en la posición 41 y otro en la posición 210 creado para el reconocimiento de corte de *MboII*. El ADN de individuos homocigóticos para el genotipo wild type (genotipo M+M+) producen dos fragmentos, uno de 175 pb y otro de 169 pb, mientras que el ADN de individuos homocigóticos para el tipo de variante genotipo homocigótico (genotipo M-M-) produce dos fragmentos de 210 y 175 pb siendo el genotipo heterocigótico (genotipo M-M+) identificado por la presencia de los fragmentos: 210, 175 y 169 pb. La presencia de dichos fragmentos permite la discriminación del genotipo con *MboII*. Por esta razón, la visualización del fragmento de 41 pb no es necesaria para la identificación de la región promotora 5' (Fig. 6).

**Figura 6.-Productos de la enzima de restricción MboII.**



M: marcador de ADN; 1=Mutante homocigoto (genotipo M-M-, 210 y 175 pb); 2= Mutante heterocigoto (genotipo M+M-, 210,175 y 169 pb); 3=genotipo wild type (175 y 169 pb)



### 3.1.3- Genotipación del CYP3A5

A la hora de estudiar CYP3A5 nos basamos en el estudio concreto de dos variantes alélicas CYP3A5\*3 por ser el polimorfismo funcional más frecuente de la población caucásica (91%) y CYP3A5\*6 por presentar una frecuencia en la población hispana del 4% aproximadamente y nuestro interés se basó en contrastar dicha cifra con la población caucásica, así como poder detreminar su posible participación en el metabolismo de ebastina.

La mutación CYP3A5\*3 se localiza en el intrón 3 produciéndose un cambio de la base Adenina por Guanina en la posición 6986 (A6986G), mientras que la mutación CYP3A5\*6, se localiza en el exon 7 donde se produce el cambio de Guanina por Adenina en la posición 14690 (G14690A).

Las frecuencias de las variantes alélicas CYP3A5\*3 y CYP3A5\*6 fueron analizadas en la población objeto de estudio según un método de PCR-RFLP previamente descrito (van Schaik y cols., 2002).

En primer lugar, las mutaciones fueron analizadas empleando los cebadores descritos en la tabla VI (van Schaik y cols., 2002), dando lugar a un producto de PCR de 293 pb para CYP3A5\*3 y de 495 pb para CYP3A5\*6.

Las reacciones de PCR para ambos alelos fueron realizadas en un volumen total de 50  $\mu$ l, para ello se utilizaron  $\approx$ 50 ng de ADN genómico, 40 pmol de oligonucleótidos, 200  $\mu$ M dNTPs (Invitrogen, Invitrogen S.A., Barcelona, España), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Ecotaq (Ecogen, Ecogen S.R.L., Barcelona, España) y tampón 10X de reacción [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl y 0,1% Tween-20 (Ecogen)]. Los ciclos para la amplificación de los alelos se comenzaron con una desnaturalización inicial de 94°C durante 7 min, seguido de 35 ciclos en los que se incluía una desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 55°C durante 1

min y una extensión a 72°C durante 1 min. Después de la finalización de los ciclos, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 min.

Alícuotas de 5 µl de cada producto de PCR fueron digeridas con las endonucleasas de restricción empleando 5 y 10 U de *SspI* y *DdeI* respectivamente, (New England Biolabs, Beverly, MA), (tabla VI) en un volumen total de reacción de 10 µl, incubándose posteriormente la mezcla de reacción a 37°C, durante 2 horas. Los fragmentos de la digestión fueron separados por electroforesis durante 2 horas a 150 V/h en geles de agarosa al 4%, teñidos con 20 µl de bromuro de etidio (10mg /ml), siendo posteriormente visualizados en un transiluminador de luz UV.

Los fragmentos obtenidos para el genotipo wild type y las variantes alélicas están indicados en la tabla VI.

**Tabla VI.- Cebadores PCR-RFLP, tamaño del producto de PCR, enzimas de restricción empleadas y tamaño de los fragmentos obtenidos para el genotipo wild type y las variantes alélicas de CYP3A5.**

Alelo CYP3A5	Cebadores	producto PCR Pb	Enzima	Tamaño fragmentos, pb	
				Alelo wild type	Alelo mutado
*3	5'-CATCAGTTAGTAGACAGATGA-3'  5'-GGTCCAAACAGGGAAGAAATA-3'	293	<i>SspI</i>	148, 125, 20	168, 125
*6	5'-GTGGGGTGTTGACAGCTAAAG-3'  5'-TGGAAGATGATTCAGCAGATAGT-3'	495	<i>DdeI</i>	230, 137, 103, 25	230, 137, 128

### 3.1.4- Genotipación del CYP2J2

Se consideraron para el mismo estudio de genotipación, los polimorfismos funcionales para dicho gen que hasta ahora habían sido identificados mediante análisis de secuenciación (King y cols., 2002). 5 de estas mutaciones, *CYP2J2\*2*, *CYP2J2\*3*, *CYP2J2\*4*, *CYP2J2\*5* y *CYP2J2\*6* fueron localizadas en regiones exónicas provocando sustituciones de aminoácidos. Además, una mutación más frecuente G-76A (*CYP2J2\*7*) se encontró en la región proximal del promotor CYP2J2 (King y cols., 2002).

En primer lugar, se analizaron mutaciones conocidas presentes en la región proximal del promotor y en algunas regiones exónicas (exones 3, 4 y 8) las cuales se amplificaron usando los cebadores descritos en la tabla VII (King y cols., 2002). Sin embargo, con el fin de detectar el alelo *CYP2J2\*3*, el cual presenta una mutación 14,532C>T en el exon 3 resultando un cambio de aminoácido generamos un sitio adecuado de reconocimiento para la endonucleasa *HgaI*, creando un nuevo par de bases en el cebador a partir de la secuencia publicada: Acceso No AF272142, (5'-GGTTTAGGAAAGAAGAGCTTAGAGGG-3'), (señalado en negrita) y (5'-CTGTCCAATGAACAAATGGGC-3') dando lugar a un producto de PCR de 135 pb (pares de bases).

Las reacciones de PCR para el alelo *CYP2J2\*7* fueron realizadas en un volumen total de 50 µl, para ello se utilizaron ≈50 ng de ADN genómico, 40 pmol de oligonucleótidos, 200 µM dNTPs (Invitrogen, Invitrogen S.A., Barcelona, España), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de *Ecotaq* (Ecogen, Ecogen S.R.L., Barcelona, España) y tampón 10X de reacción [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl y 0,1% Tween-20 (Ecogen)].

Tabla VII.- Secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores

Nombre del cebador	Secuencia	Referencia
2J2*3-F	5'-TCAAGTGCCTTAATGATCTTC-3'	king y cols. ,2002
2J2*3- R	5'-CCTTACACTGCATCTGACATA-3'	king y cols. ,2002
2J2*4- R	5'-CCATCTGTGGCTGACATCGGC-3'	king y cols. ,2002
2J2*4-F	5'-TGGCCAGCTCCTCATATATGG-3'	king y cols. ,2002
2J2*8-F	5'-CTCTAGCAGAGGCAATGAATG-3'	king y cols. , 2002
2J2*8-R	5'-GAAGCCGGAGGATGACCACCC-3'	king y cols. ,2002
2J2*7-F (Prm)	5'-CAGGCACAGTTCCAATCATAG-3'	king y cols. ,2002
2J2*7-R (Prm)	5'-CACCTCTTCCTGCCCTTCATC-3'	king y cols. ,2002

**F=forward;R=reverse;Prm=promotor**

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos en los que se incluía una desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 57°C durante 30 s y una extensión a 72°C durante 30 s. Después de la finalización de los ciclos, se realizó una extensión final a 72°C durante 7 min.

La misma mezcla de reacción de PCR y las mismas condiciones fueron aplicadas para amplificar los exones 3, 4 y 8 usando como temperaturas de hibridación 55°, 60° y 60° respectivamente.

La región del promotor se amplificó como se describe previamente según King y cols., (King y cols., 2002) dando lugar a un producto de PCR de 618 pb.

Alícuotas de 5 µl de cada producto de PCR fueron objeto de análisis con endonucleasas de restricción empleando 3U de *TseI* y 10 U de *HgaI* y *NfeI* respectivamente (New England Biolabs, Beverly, MA) (tabla VIII). Se añadieron controles de ADN positivos para revisar la fiabilidad de las digestiones de *TseI*, *HgaI* y *NfeI*, por no existir un sitio constitutivo de restricción para estas endonucleasas (tabla VIII). Las digestiones de los productos de PCR (tabla VIII), con *HgaI*, se limitaron a incubaciones máximas de 1 hora ya

que una exposición mayor podría causar descensos en la actividad del enzima. Los fragmentos de digestión fueron separados por electroforesis durante 2 horas a 150 V/h en geles de agarosa al 2% (análisis CYP2J2\*2, CYP2J2\*3, CYP2J2\*4, CYP2J2\*6) o al 3% (análisis CYP2J2\*7), siendo posteriormente visualizados en un transiluminador de luz UV por tinción con bromuro de etidio (Sigma Aldrich) (10 mg/ml). En los extremos del gel se cargan marcadores estándar de tamaño de banda conocido. Si hay suficiente ADN para su visualización directa, se procede al cálculo de los tamaños de los productos de la digestión enzimática.

El tamaño de los productos amplificados tanto para los alelos wild type como los mutados, queda reflejado en la tabla IX (a continuación). La figura 7 ilustra el análisis del alelo CYP2J2\*7.

**Tabla VIII.- Endonucleasas, tiempos de incubación y temperatura para cada alelo CYP2J2 analizado.**

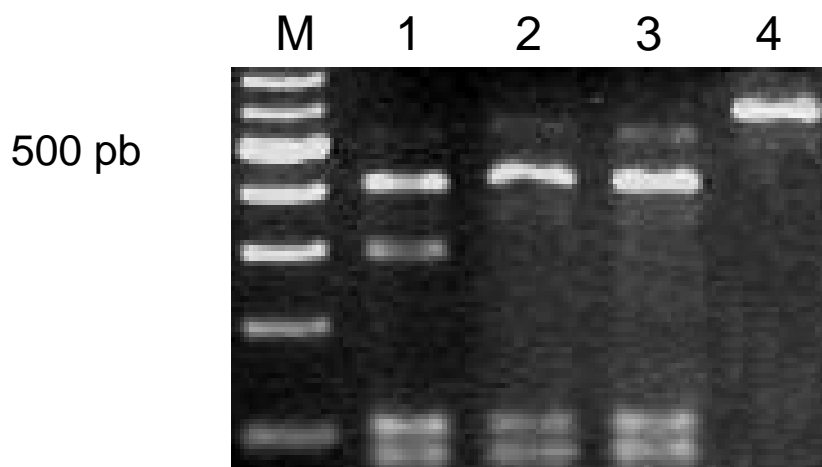
	CYP2J2*2	CYP2J2*3	CYP2J2*4	CYP2J2*6	CYP2J2*7
Cambios nucleótido	14,487A>G	14,532C>T	15,028T>A	25,661A>T	-76G>T
Productos PCR, pb	531	135	354	423	618
Endonucleasa	TseI	HgaI	MfeI	Tsp509I	BfaI
Tiempo Incubación	2 horas	1 hora	2 horas	2 horas	2 horas
Temperatura	65°	37°	37°	65°	37°

**Tabla IX.- Productos de PCR y tamaño de fragmentos digeridos obtenido para cada alelo CYP2J2 analizado.**

	CYP2J2*2		CYP2J2*3		CYP2J2*4		CYP2J2*6		CYP2J2*7	
	Wt	Mut	Wt	Mut	Wt	Mut	Wt	Mut	Wt	Mut
Tamaño	531				354			401	417	307
de		362		135		182	259		112*	112
fragmento,		169	100		172	164				110
<b>Pb</b>			35				22*	22	89*	89

\*Sitios constitutivos de las endonucleasas de restricción. Wt= wild type; Mut= mutante.

**Figura 7.- Análisis PCR-RFLP para el alelo CYP2J2\*7**



M=marcador de ADN; 1= heterocigoto; 2 y 3= wild type; 4= producto de PCR no digerido.

### **3.1.5.- Frecuencias alélicas del CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 en la población española**

Las diferencias inter-étnicas en las frecuencias del alelo CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 respectivamente, fueron comparadas mediante el uso del test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y el test exacto de Fisher. Para ver si las frecuencias de los genotipos se encontraban equilibradas, se

empleó la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg. Con esta ley, se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas a partir de las frecuencias alélicas.

Las frecuencias genotípicas esperadas calculadas a partir de los alelos respectivos a CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 estudiados, se calcularon de la siguiente manera:

Frecuencia de los homocigotos (A): (frecuencia A)<sup>2</sup>.

Frecuencia de los heterocigotos (AB): 2 x (frecuencia A x frecuencia B).

Las frecuencias obtenidas y esperadas se compararon mediante la utilización de un test Chi-cuadrado.

### **3.2.-Desarrollo y optimización de las técnicas analíticas de cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas (LC/MS)**

Para la determinación de ebastina y metabolitos se siguieron los siguientes pasos:

- a.- Preparación de la muestra de orina
- b.- Extracción en fase sólida.

#### ***3.2.a.- Preparación de la muestra de orina***

- Partimos de 2000 µl de orina (previamente filtrada con filtro de acetato de 0,22 µ acoplado a jeringa), que se pasan a tubos de vidrio de 15 ml con tapón de rosca.

En el caso de muestras de plasma se tomaron 500 µl de plasma y se pasaron a tubos de vidrio de 15 ml con tapón de rosca.

- Adicionamos 50 µl de una solución de flunarizina, en una concentración de 5 µg/ml en metanol. La flunarizina se usará como estándar interno (I.S). Se agitan los tubos lentamente en vórtex durante unos segundos.

- Se añaden 2 ml de una solución de metanol-acetonitrilo (1:1, V/V).
- Después de agitar durante 10 segundos, se añaden 2 ml de agua destilada y 1 ml de una disolución buffer acetato 0,2 M (pH= 4), con el fin de ionizar los compuestos presentes en la orina, y así disminuir el valor del pH.
- Tras ese tiempo, se centrifugan los tubos a 4000 rpm durante 12 minutos y a una temperatura de 4 ° C.
- Una vez que los tubos han sido centrifugados, se lleva el sobrenadante de los mismos a unos cartuchos Sep-pak (Waters) previamente acondicionados como se explica a continuación.

### ***3.2.b.- Extracción en fase sólida***

Las muestras de orina fueron procesadas mediante extracción en fase sólida (SPE), para ello, se usaron cartuchos de extracción rellenos de una estructura polimérica C18 (Sep-Pak C18, 3cc/ 360 mg, Waters Corporation, USA.).

- El sobrenadante (apartado anterior) es llevado al cartucho previamente condicionado, en una estación de vacío llamada manifold (Waters Corporation).
- Los cartuchos SPE fueron activados añadiendo dos veces 3 ml de metanol seguidos de dos veces 3 ml de agua destilada, antes de llevar la muestra al cartucho.
- Una vez pasada la muestra por el cartucho, se colocan tubos de vidrio de fondo redondo en la gradilla del manifold y se procede a la elución de los compuestos.
- Ebastina y sus metabolitos fueron eluidos con 2 ml de metanol seguidos de 2 ml de una disolución metanol- buffer fosfato 50 mM (pH= 2,5), (9:1, V/V).



- El eluato es evaporado a sequedad colocando los tubos en un baño a 55° C, haciendo pasar por ellos una corriente suave de nitrógeno, durante aproximadamente 40 minutos.
- El extracto seco (que queda en el fondo de los tubos) se redisuelve con 100 µl de fase móvil (Acetonitrilo 52% / buffer acetato 48%).
- Se inyectan 30 µl en cromatógrafo.

### 3.3.- Cuantificación metabólica

Se prepararon distintas soluciones de almacenamiento para cada compuesto, quedando identificados así:

#### Soluciones stock:

Se disolvieron la sustancia pura de EBT y los compuestos restantes junto al IS en metanol para crear soluciones stock (125 µg/ml) y posteriormente se almacenaron a 4°C.

De éstas soluciones que se conservan a -4°C, se obtienen otras disoluciones (por dilución en metanol), que serán las empleadas para obtener los calibradores (muestras de concentración conocida, usadas para la realización de curvas de calibración).

Estas otras diluciones quedan identificadas así.

#### Soluciones de trabajo:

<b>Desbutirofenona</b>	<b>Carebastina</b>	<b>Hidroxi abbastina</b>	<b>Ebastina</b>
A = 0,05 µg/ml	A = 0,05 µg/ml	A = 0,05 µg/ml	A = 0,05 µg/ml
B= 0,5 µg/ml	B= 0,5 µg/ml	B= 0,5 µg/ml	B= 0,5 µg/ml
C= 10 µg/ml	C= 10 µg/ml	C= 10 µg/ml	C= 10 µg/ml
D= 31,25 µg/ml	D= 31,25 µg/ml	D= 31,25 µg/ml	D= 31,25 µg/ml

A partir de esas soluciones de trabajo, se prepararon los calibradores, diluyéndolas de nuevo, ésta vez con orina blanco (de personas con abstinencia total de fármacos y alcohol, durante al menos 48 horas), hasta conseguir las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla X.

**Tabla X.- Concentraciones de los diversos calibradores o patrones empleados para la realización de las distintas curvas de calibración en orina. (Concentraciones expresadas en ng/ml. Pm= peso molecular).**

<b>CALIBRADORES</b>								
	<b>Pm</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Desbp</b>	267	30	50	200	500	2000	5000	10000
<b>Carebastina</b>	500	30	50	200	500	2000	5000	10000
<b>Oh-ebastina</b>	486	30	50	200	500	2000	5000	10000
<b>Ebastina</b>	470	0,3	3	30	50	200	500	2000

La solución del IS fue diluída en metanol hasta una concentración final de 5 µg/ml (solución de trabajo). El procesamiento de éstos calibradores es el mismo que para las muestras normales (apartado 3.2, de extracción urinaria).

Se realiza una calibración cada vez que se analiza una serie de muestras (un estudio), y cada vez que se produce un cambio en la técnica, que haga variar las condiciones cromatográficas o de extracción. La cuantificación de los picos se realiza extrapolando la concentración (µmol/l) a la relación entre los índices de altura de los picos obtenidos: altura del pico del analito / altura del pico del estándar interno. Los criterios estadísticos de aceptación que se tuvieron en cuenta fueron el coeficiente de correlación lineal ( $r > 0,99$ ), el

coeficiente de correlación cuadrático ( $r^2 > 0,98$ ) y la prueba de hipótesis nula de la pendiente ( $b=0$ ) con  $p < 0,05$ .

Al mismo tiempo que se hace la calibración, también se procesan unos controles de calidad (CCs), es decir, unas muestras de concentraciones conocidas, preparadas de forma similar a los calibradores, pero que se inyectan como muestras de concentración desconocida; esto nos da una idea de la reproducibilidad de la calibración realizada. Las concentraciones se suelen intercalar entre las concentraciones de los calibradores. Normalmente se inyectan 3 CCs por duplicado tras la calibración, y por cada cierto número de muestras determinado. En nuestro caso, los CCs usados fueron los que refleja la tabla XI.

Las curvas estándar fueron obtenidas representando gráficamente los ratios de las áreas de los picos de ebastina y sus metabolitos con respecto al estandar interno (y) frente a las respectivas concentraciones de cada compuesto añadido en plasma y en orina (x), usando el coeficiente de regresión lineal  $1/(\text{concentración})^2$ .

**Tabla XI.- Concentraciones de los diversos controles de calidad empleados en orina.**  
Concentraciones expresadas en ng/ml.

<b>CONTROLES DE CALIDAD (CCs)</b>			
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>desbutirofenona</b>	30	200	2000
<b>carebastina</b>	30	200	2000
<b>Oh-ebastina</b>	30	200	2000
<b>ebastina</b>	3	30	200

La cuantificación metabólica es llevada a cabo por medio del programa informático “ HP Chemstation [ Rev. A. 06.03 (509) ] “.

### **3.4.- Técnica analítica cromatográfica**

#### **3.4.1.- Protocolo de validación**

Los protocolos de validación de los métodos analíticos cromatográficos incluyen el análisis de diferentes parámetros como la linealidad, recuperación, exactitud, precisión y sensibilidad. Uno de los trabajos realizados en la presente Tesis fue el desarrollo y validación de un nuevo método de LC/MS con detección de UV en orina. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros analíticos:

#### **3.4.2.- Linealidad del método**

La linealidad se define como la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas linealmente proporcionales a la cantidad o concentración del analito en un intervalo para el cual resulta satisfactorio. La linealidad del sistema se ha determinado utilizando como medio biológico orina, realizando el ensayo por duplicado para 7 concentraciones crecientes de cada analito mencionadas en el apartado 3.3 (calibradores).

#### **3.4.3.- Recuperación del método**

El porcentaje de recuperación de la muestra se calculó comparando las áreas de los picos de los controles de calidad (CCs) extraídos de plasma y orina con las áreas de los picos de muestras de plasma y orina blanca conteniendo los analitos en las mismas concentraciones. El ensayo se realizó preparando curvas de calibración en orina blanco. Para el cálculo de porcentaje de recuperación de cada analito se utilizaron los índices de área, aceptándose una diferencia por encima del 50%:  $(\text{índice área con extracción} / \text{índice área sin extracción}) \times 100$ .

#### **3.4.4.- Precisión y exactitud del método**

Exactitud es la capacidad que tiene un método analítico para dar resultados próximos al valor verdadero.

La Precisión es la concordancia que existe entre los resultados obtenidos de los analitos ensayados varias veces sobre una misma muestra, e incluye la repetibilidad y reproducibilidad. La Repetibilidad o variabilidad intra día, es la repetición de una muestra con la misma concentración, en las mismas condiciones de trabajo y en el mismo día. El ensayo se realizó por triplicado, para los cuatro analitos, en las tres concentraciones intermedias de la curva de calibración (30, 200 y 2000 ng/ml). La reproducibilidad o variabilidad inter día es la repetición de dos curvas de calibración en dos días distintos, realizadas por dos analistas diferentes. La reproducibilidad del método se determinó en orina. La precisión y la exactitud de los métodos en orina fueron evaluadas en el mismo día (n=10) y en diferentes días comparando los resultados obtenidos al analizar las muestras CCs y, expresando dichos resultados como desviación estándar relativa (coeficiente de variación, CV) y error relativo, aceptándose valores de CVs menores del 15%:  $CV(\%) = (\text{desviación típica} / \text{media de concentraciones}) \times 100$ .

La variación inter día fue establecida a lo largo de 5 días con 5 curvas de calibración diferentes.

#### **3.4.5.- Sensibilidad del método**

Para analizar la sensibilidad del método se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación para los cuatro analitos. El límite de cuantificación se define como la concentración más baja que presenta una precisión aceptable para todos los analitos de al menos un valor del  $100 \pm 20\%[(\text{concentración media} / \text{concentración teórica}) \times 100\%]$  siendo el

valor de la desviación estándar relativa no mayor al 20%. El límite de detección se define como la señal del ruido de la línea base multiplicada por tres. Se calculó la concentración de esta altura de ruido, partiendo de una concentración conocida de cada uno de los puntos en varias curvas de calibración.

### 3.5.- Ratios urinarios de ebastina

Se evaluaron varios ratios urinarios metabólicos de ebastina obtenidos en los distintos intervalos de recogida de orina:

<b>Ratio 1</b>	—▶	<b>DESBP/EBT 0-4 H</b>
<b>Ratio 2</b>	—▶	<b>CAREB/EBT 0-4H</b>
<b>Ratio 3</b>	—▶	<b>DESBP/EBT 4-24 H</b>
<b>Ratio 4</b>	—▶	<b>CAREB/EBT 4-24H</b>

Desbutirofenona: Desbp; Carebastina: Careb

Se calcularon también las tasas de excrección ( $\mu\text{mol}$ ) a partir de las concentraciones en orina de desbp y careb ( $\mu\text{mol/l}$ ), en los intervalos de tiempo 0-4 y 4-24h multiplicados por el volumen excretado de cada período.

### 3.6.- Análisis de los datos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando los programas JMP, versión 5.0.1 (SAS Institute Inc. Cary NC 27513, USA) y GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, EE.UU.). Las diferencias relacionadas con el sexo y tabaco en la población fueron analizadas con el uso del test de Wilcoxon de suma de rangos. Los ratios metabólicos

de ebastina fueron asociados mediante el test de correlación de rangos de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  fueron aceptados como estadísticamente significativos. Las diferencias relacionadas con la toma de zumo de pomelo se analizaron mediante test para muestras pareadas Wilcoxon matched pairs encontrándose diferencias significativas con respecto al metabolismo mediado por CYP3A, siendo  $p < 0,05$ .

## **4.- ESTUDIO POBLACIONAL**

---

### **4.1.- Estudio de genotipación CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2**

#### ***4.1.1.- Sujetos***

En este estudio participaron 134 voluntarios sanos en total, de los cuales, 102 participaron en el estudio de genotipación. De los 102 sujetos, 32 eran hombres y 70 eran mujeres, 4 de los hombres eran fumadores y de las mujeres, fumaban 15. La edad media de la población era de  $20,1 \pm 0,60$  años (rango 19 a 22).

Todos fueron debidamente informados del estudio, dando su consentimiento por escrito, siendo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Infanta Cristina, Badajoz. El estudio fue conducido de acuerdo con la Declaración de Helsinki y sus subsecuentes revisiones.

#### ***4.1.2.- Diseño del estudio***

Se recogieron muestras de sangre de los individuos de aproximadamente 10 ml en tubos conteniendo EDTA. El plasma fue inmediatamente separado por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### **4.2.- Estudio metabólico de ebastina**

#### ***4.2.1.- Sujetos***

En el estudio participaron 134 voluntarios sanos (40 hombres y 94 mujeres), 6 de ellos de nacionalidad portuguesa y el resto de nacionalidad española. Entre los hombres, 30 fueron no fumadores. Entre las mujeres, hubo 60 no fumadoras y 23 fumadoras de  $10 \pm 4$  cigarrillos



por día. La edad media de los hombres fue  $21,9 \pm 5$  años (rango 19 a 41) y de las mujeres,  $22,3 \pm 6,6$  (rango 19 a 51) años.

El peso medio de los hombres fue  $76,6 \pm 10,7$  Kg (rango 55 a 105) y de las mujeres  $57,7 \pm 7,6$  Kg (rango 42 a 88).

Todos los sujetos consumían alcohol de manera esporádica, en cantidades moderadas, y no tomaron ninguna medicación (excepto anticonceptivos orales) durante la prueba.

#### ***4.2.2.- Diseño del estudio***

Los sujetos realizaron un período de abstinencia de bebidas alcohólicas y de cualquier medicación conteniendo ebastina como principio activo durante al menos 36 horas, antes y durante el estudio.

Previo a la realización del estudio, se llevaron a cabo estudios de supresión iónica para descartar que posibles compuestos presentes en la matriz pudieran dar lugar a interferencias en la señal obtenida. De igual modo, inmediatamente antes de la administración de ebastina, se recogieron muestras blanco de orina, para detectar compuestos que pudieran interferir con el análisis y evaluar el grado de cumplimiento del período de abstinencia.

Se administró ebastina, 20 mg en dosis única (Ebastel Forte®, comprimidos, Almirall Prodesfarma, Barcelona, España), a las 8 a.m., tras el desayuno, ya que la absorción de ebastina se ve favorecida con la ingesta de alimentos y se recogió la orina, tras la ingestión de ebastina, durante diferentes intervalos de tiempo: 0-4 y 4-24 horas. Se registraron los volúmenes de orina. Se congelaron alícuotas de la orina recogida a  $-20^{\circ}$  C hasta su posterior estudio.

### **4.3.- Estudio sobre la influencia de factores ambientales en el metabolismo de ebastina: ebastina y zumo de pomelo**

#### **4.3.1.- Sujetos**

En el estudio participaron 62 personas pertenecientes al grupo inicial citado en el apartado 4.1.1, de las cuales 47 eran mujeres y 15 eran hombres, de edades comprendidas entre 19 y 22 años ( $20,16 \pm 0,68$ ).

De entre las mujeres, 10 eran fumadoras y entre los hombres fumaban 4.

Los sujetos que participaron en el estudio con zumo de pomelo, habían realizado previamente, una semana anterior el estudio de ebastina, y el análisis de ambas muestras se realizó posteriormente en el mismo día, evitando así, variaciones analíticas.

#### **4.3.2.- Diseño del estudio**

Los sujetos realizaron un período de abstinencia de bebidas alcohólicas, de cualquier tipo de zumo de frutas y/o medicación conteniendo ebastina como principio activo durante al menos 36 horas, antes y durante todo el estudio.

Inmediatamente antes de la administración de zumo de pomelo, se recogieron muestras de orina blanca, en cada sujeto para detectar compuestos que pudieran interferir con el análisis.

#### ***4.3.3.- Ingesta de zumo de pomelo y ebastina***

En primer lugar, se lleva a cabo una ingesta de zumo de pomelo (El corte Inglés®) durante 3 días consecutivos. Se ingirieron 250 ml de zumo de pomelo (100% zumo a base de zumo concentrado) tres veces al día durante los 2 primeros días, y el tercer día, por la mañana, a las 8.00 a.m. junto al desayuno, se procede a la ingesta de un único vaso de zumo de 250 ml, para pasar posteriormente a la toma de un solo comprimido de ebastina de 20 mg (Ebastel Forte®, comprimidos, Almirall Prodesfarma, Barcelona, España).

La recogida de muestras de orina se llevó a cabo de forma idéntica al apartado 4.2.2.

## 5.- MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO EMPLEADO EN LAS DISTINTAS TÉCNICAS

---

- Agitador magnético para disoluciones, modelo Agimatic (P-Selecta).
- Agitador de tubos, tipo vórtex, modelo Reax 2000 (Heidolph).
- Autoclave P-SELECTA
- Balanza Mettler®, modelo H31AR.
- Balanza PRECISA, modelo 1000C-3000D.
- Baño con agitador, modelo Unitronic 3200R (P-Selecta).
- Bomba de vacío para extracción en fase sólida Dinko, modelo D-95.
- Bomba de vacío para filtración Dinko, modelo D-95.
- Botes colectores de orina de 2 litros de capacidad (Eurotubo®).
- Campana extractora de gases CAPTAIR, modelo 4007A.
- Cartuchos C18 (Sep-pak plus, 3cc/360 mg, Waters Corporation, USA).
- Centrífuga, Biofuge 13 (Heraeus sepatech).
- Centrífuga refrigerada, Megafuge 1.0R (Heraeus sepatech).
- Columnas de filtrado de DNA QIAGEN 500, QIAGEN.
- Conexiones de entrada (Waters®).
- Dosificadores de plástico Dispensette® (Brand).
- Estación de vacío con rack para tubos de 13 x 100 mm, provista de 20 agujas de propileno y 20 tapones.(Waters Cromatografía, S.A. Madrid, España).
- Filtros GVWP de polipropileno, 0,22  $\mu\text{m}$ , 47 mm  $\varnothing$ , para la filtración de fases móviles (Millipore).
- Filtros para jeringas, de acetato, 0,22 $\mu\text{m}$ , 25mm  $\varnothing$ ; Cameo 25A (Micron separations Inc.).
- Gradillas, soportes y enganches (Waters®).
- Guantes de látex (Sanex).
- Jeringas estériles desechables de 10 ml, Discardit II (Becton Dickinson).
- Material de vidrio: probetas (Brand), matraces, vasos de precipitados y botes con tapón de rosca de diversos volúmenes (Schott Duran).
- Matraz kitasato, para filtración.
- Medidor de pH,  $\Phi$ 12 pH/ISE Meter (Beckman).

- Multipipeta automática regulable (Eppendorf®).
- Parafilm ®.
- Pipetas automáticas de volumen regulable, de 5 ml y de 1 ml (Biohit Proline®), y de 10, 20, 100 y 200 µl ( Eppendorf®, Hamburgo, Alemania).
- Puntas de plástico desechables para pipetas automáticas, de distintos volúmenes. (Daslab®).
- Refrigeradores y congeladores (Liebherr).
- Sistema de LC/MS: Los componentes utilizados en cada técnica de LC/MS se detallarán en cada apartado. En todos los casos se utilizó el programa informático “ HP Chemstation [ Rev. A. 06.03 (509) ] “.
- Tubos Falcon estériles de 50 y de 15 ml Becton Dickinson.
- Tubos de vidrio de 15 ml con tapón de rosca cubierto de teflón.
- Tubos Eppendorf® de 1,5 y 2 ml de volumen.
- Tubos Venoject (Terumo Europe NV, Leuven, Bélgica).
- Tubos de vidrio cónicos de 10 ml sin rosca (Pobel).
- Válvulas individuales de control de vacío para estación de vacío.(Waters®).
- Viales de centelleo de 20 ml (Sigma).
- Vórtex Heidolph, Reax 2000.

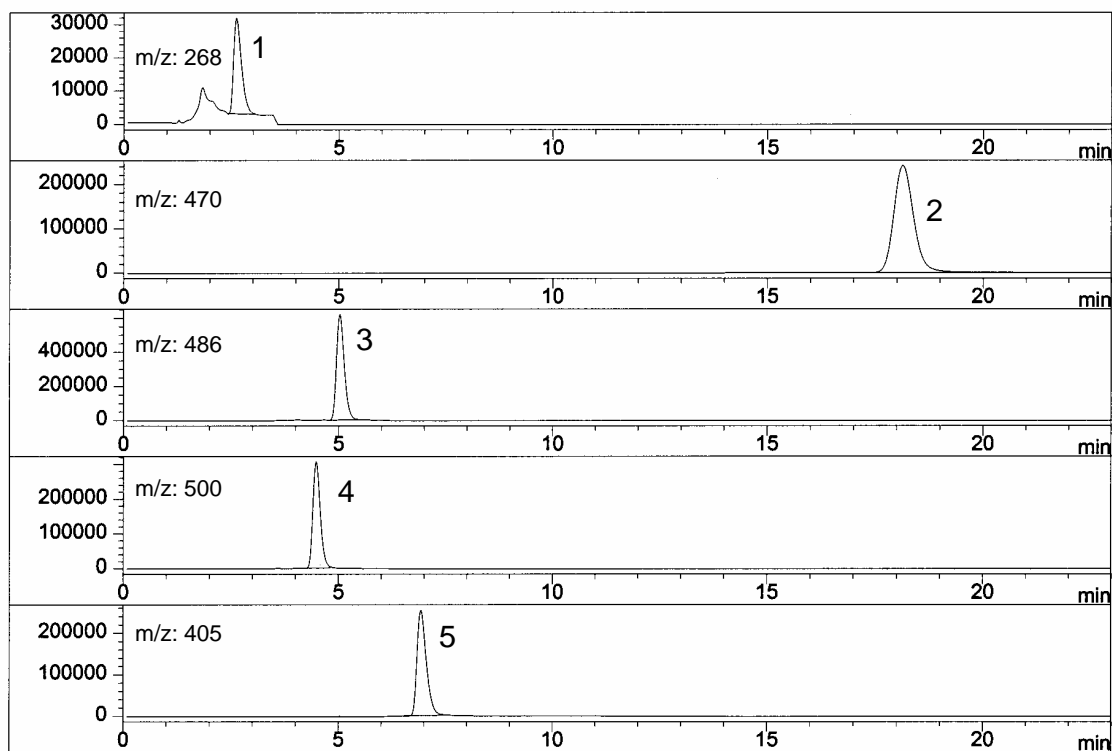
# **RESULTADOS**

## 1.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE EBASTINA Y METABOLITOS EN ORINA

---

La identificación de las moléculas protonadas se realizó mediante el cociente  $m/z$  obteniendo un valor de 268 para desbutirofenona, 405 para flunarizina (I.S.), 470 para ebastina (EBT), 486 para hidroxibebastina y 500 para carebastina. De modo que, todos estos iones fueron seleccionados para la detección en modo SIM (monitorización selectiva de masa atómica) y para el análisis cuantitativo. Las inyecciones del LC/MS para las muestras de ebastina y sus metabolitos extraídas en orina se llevan a cabo aproximadamente en menos de 20 minutos; similar a otros estudios publicados previamente (Hashizume y cols., 2001, Matsuda y cols., 2001). La figura 8 muestra los cromatogramas en modo SIM de muestras de orina blanca (orina procedente de neonatos), a las que se añadieron los compuestos patrones. Mediante esta técnica cromatográfica, se consiguió una perfecta separación y resolución de los picos cromatográficos. Los tiempos de retención en minutos fueron aproximadamente 2,5, 4,3, 4,8, 6,7 y 17,5 para desbutirofenona (Desbp), carebastina (Careb), hidroxibebastina (Ohebt), IS y EBT, respectivamente (Fig. 8).

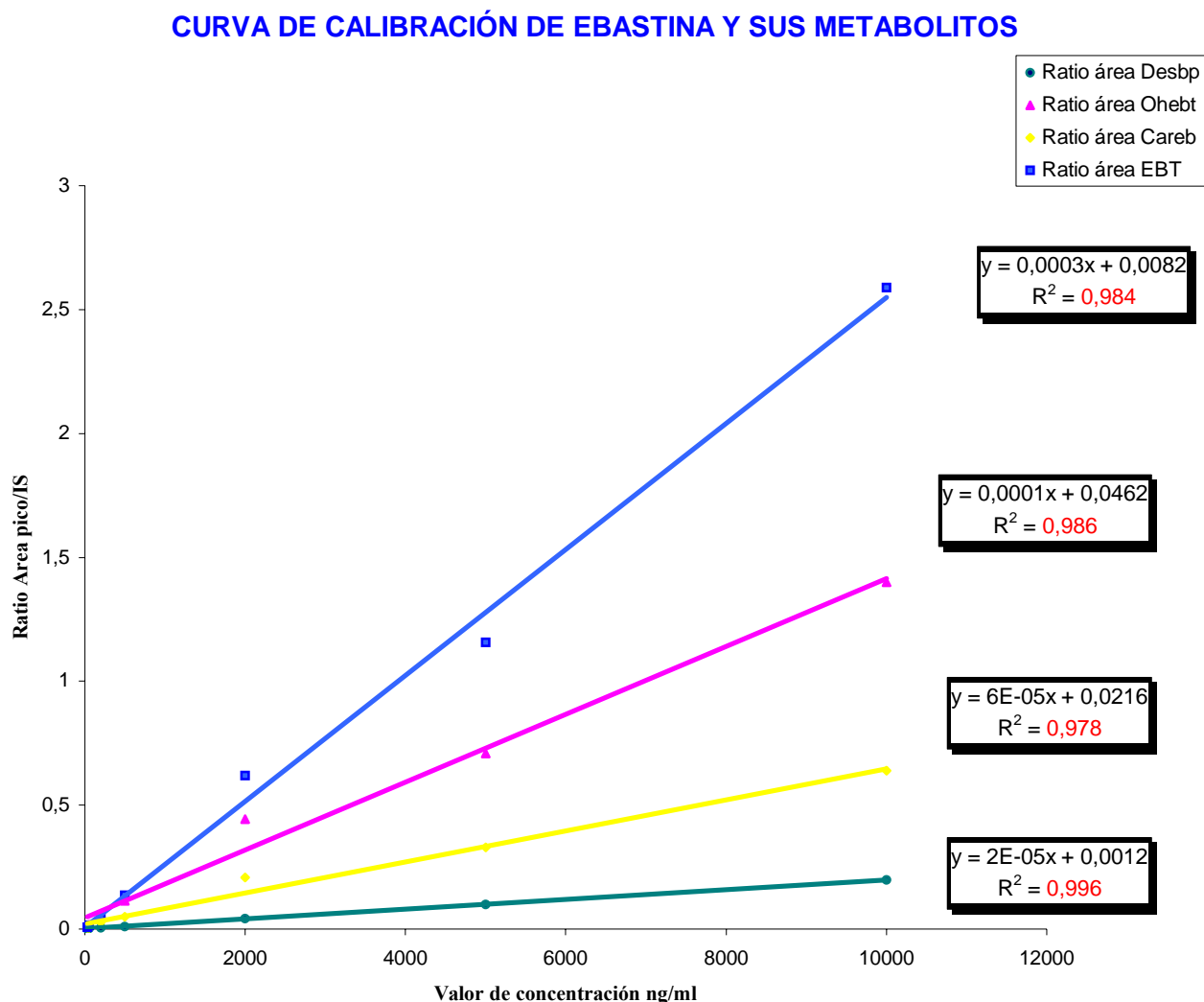
**Figura 8. Cromatogramas obtenidos a partir de orina blanca extraída conteniendo concentraciones conocidas de EBT y metabolitos. Concentración: 500 ng/ml. (1) desbutirofenona, (2) EBT, (3) hidroxiebastina, (4) carebastina y (5) IS**



Las curvas de calibración realizadas para cada compuesto en orina, en el rango de concentraciones establecidas (0,3-10.000 ng/ml) resultaron totalmente lineales, siendo las medias de los coeficientes de correlación  $r$  los siguientes: EBT [0,992], hidroxiebastina [0,993], carebastina [0,989] y desbutirofenona [0,998]. Como ejemplo, en la figura 9 se muestra la curva de calibración para ebastina y metabolitos en orina.



**Figura 9.- Curva de calibración utilizada en la cuantificación de ebastina y sus metabolitos en orina. Desbutirofenona (Desbp), carebastina (Careb), hidroxiebastina (Ohebt) y ebastina (EBT).**



**1.1.- Precisión y eficacia** de las diversas técnicas se evaluaron a partir de una serie de paneles de muestras de distintos CCs (n=10). Los datos referentes a los coeficientes de recuperación de las extracciones resultaron ser > 58,8% para desbutirofenona, 85,6% para carebastina, 97,1% para hidroxiebastina, 96,2% para EBT y 95,5% para el I.S. El valor medio absoluto de los coeficientes de recuperación de todos los analitos, excluyendo el

metabolito farmacológicamente inactivo, desbutirofenona, fue mayor al 90%. Por lo tanto este método de preparación de las muestras puede ser aplicado en esta matriz biológica.

La desviación estándar relativa intra-día e inter-día (RSD) y la eficacia del método para muestras de orina, se muestran en la tabla XII. La exactitud intra-día para todos los compuestos varió desde un 93,4% a un 108,2%, mientras que RSD presentó rangos de 2,1-10,63. La exactitud de la técnica inter-día varió desde un 86,9% a un 113,34% en orina, con un valor de RSD variando en un rango desde 1,0 a 11,8.

**1.2.- Sensibilidad y selectividad** del método LC-MS, como se ilustra en la figura 8, se demostró por la alta resolución de los compuestos y por la ausencia de sustancias endógenas en las muestras de orina blanca que pudieran interferir en la cuantificación de ebastina y sus principales metabolitos.

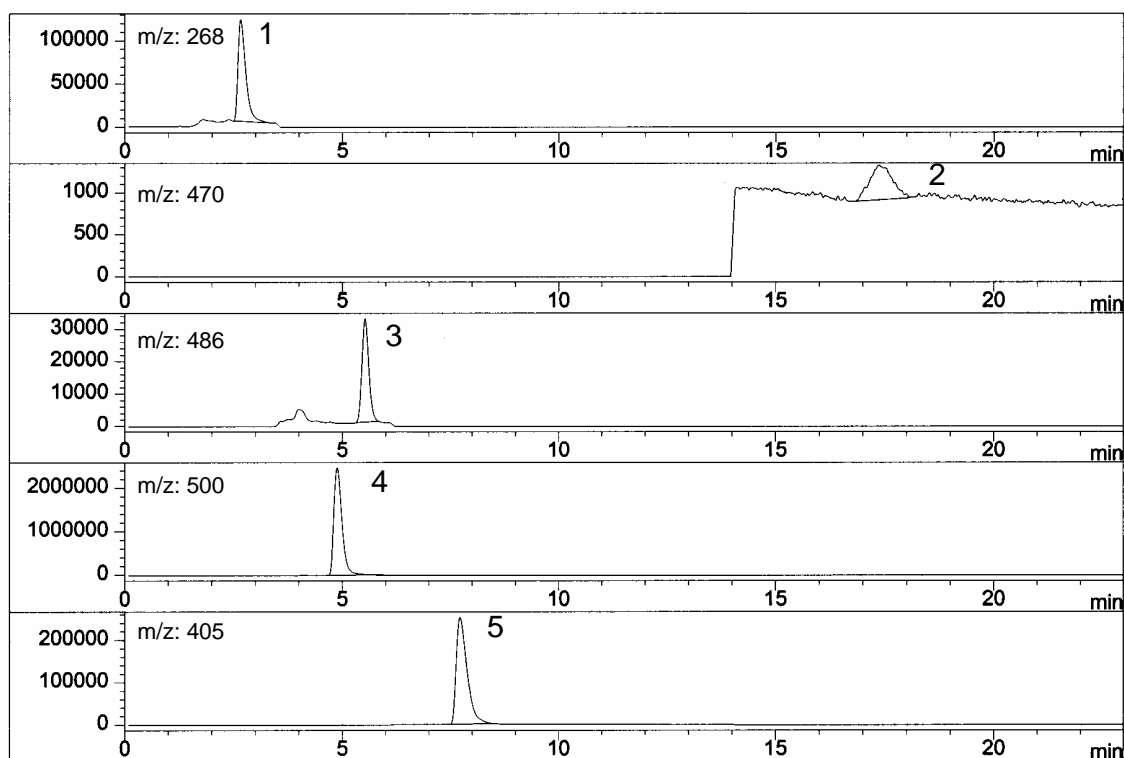
El límite más bajo de cuantificación (LLOQ) para los analitos fue de 0,3 ng/ml. Este límite está al menos entre 10 y 90 veces más bajo que en otros métodos previamente publicados (Hashizume y cols., 1998, Marino y cols., 1996, Matsuda y cols., 2001, Vincent y cols., 1988). Partiendo de esta sensibilidad, es posible poder detectar el fármaco inalterado EBT y otros metabolitos menores tales como hidroxiebastina cuando se analizan muestras de pacientes. De hecho, hasta ahora, se había informado repetidas veces de la ausencia de detección de fármaco parental (EBT) en orina (Matsuda y cols., 2001, Yamaguchi y cols., 1994).

La figura 10, muestra un cromatograma en modo SIM de ebastina y sus metabolitos obtenido de un individuo tras la recogida de orina durante 4 horas tras la administración de una dosis oral única de 20 mg de EBT. Todos los analitos incluyendo ebastina e hidroxiebastina, fueron perfectamente cuantificables en concentraciones expresadas en ng/ml.

Tabla XII.- Coeficientes de variación intra e inter-día para la determinación de ebastina (EBT) y sus metabolitos en orina.

Análito	Conc. nominal (ng/ml)	INTRA-DÍA				INTER-DÍA			
		Conc. observada (ng/ml)	Precisión (RSD) (%)	Exactitud (%)	Conc. observada (ng/ml)	Precisión (RSD) (%)	Exactitud (%)	Exactitud (%)	
<b>EBT</b>	3	2,94±0,23	7,92	97,85	3,15±0,07	2,11	104,89	104,89	
	30	29,33±1,69	5,77	97,77	28,18±3,32	11,79	93,93	93,93	
	200	192,56±13,28	6,90	96,28	173,78±19,93	11,47	86,89	86,89	
<b>Hidroxi abbastina</b>	30	32,05±2,75	8,57	106,85	32,37±2,3	7,11	107,90	107,90	
	200	186,98±17,17	9,18	93,49	214,57±23,22	10,82	107,28	107,28	
	2000	2163,66±230,09	10,63	108,18	2010,67±48,08	2,39	100,53	100,53	
<b>Carebasta</b>	30	28,98±2,12	7,31	96,60	32,53±1,34	4,13	108,43	108,43	
	200	214,86±21,20	9,87	107,43	176,13±1,77	1,0	88,07	88,07	
	2000	2028,66±42,40	2,09	101,43	2141,09±116,6	5,45	107,05	107,05	
<b>Desbutirofenona</b>	30	28,04±1,89	6,73	93,45	34,00±2,78	8,16	113,34	113,34	
	200	192,24±11,33	5,89	96,12	193,71±13,40	6,92	96,85	96,85	
	2000	2025,18±69,87	3,45	101,26	1911,72±135,93	7,11	95,59	95,59	

**FIGURA 10.-** Cromatogramas correspondientes al análisis de orina de 0-4 horas tras la administración de ebastina oral 20 mg en un voluntario sano. (1) desbutirofenona, (2) EBT, (3) hidroxiebastina, (4) carebastina y (5) IS



## **2.-ESTUDIO DE GENOTIPACIÓN DE LOS CITOCROMOS P450 3A (CYP3A) Y 2J2 (CYP2J2)**

---

### **2.1.- Frecuencias alélicas del CYP3A4 y CYP3A5 en la población española**

Se determinaron los alelos CYP3A4\*1B, CYP3A5\*3 y CYP3A5\*6 así como sus diferentes combinaciones genotípicas, en la población de 102 voluntarios sanos, con el fin de identificar las diferencias de distribución de tales variantes en esta población con respecto a otras poblaciones Caucásicas y al mismo tiempo poder identificar la posible repercusión sobre el metabolismo de ebastina.

Dichos genotipos se determinaron de forma satisfactoria mediante las técnicas empleadas. 7 individuos fueron heterocigotos para la variante CYP3A4\*1B (frecuencia alélica,  $q = 0,034$ ), mientras que no se encontraron individuos homocigotos para dicha variante (tabla XIII). El alelo CYP3A5\*3 estuvo presente en la población con una frecuencia del 91% (frecuencia alélica,  $q = 0,91$ ), 2 sujetos fueron homocigotos para esta variante y 14 fueron heterocigotos (tabla XIII). La variante alélica CYP3A5\*6, estuvo ausente en toda la población. Todas las frecuencias observadas para los genotipos CYP3A4 y CYP3A5 se encontraban en equilibrio de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 1,185$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,55$ ;  $\chi^2 = 0$ ,  $df = 2$ ,  $p = 1$ , para CYP3A4 y CYP3A5 respectivamente).

La estratificación de la población, de acuerdo con los genotipos de ambos citocromos CYP3A4 y CYP3A5 presentó 5 combinaciones genotípicas diferentes. Como es de esperar en caucásicos, la mayoría de los sujetos (93%) fueron wild type para CYP3A4 y mutantes homocigotos para CYP3A5\*3 (84%), lo cual se traduce en estos últimos en una carencia del enzima funcional.

Tabla XIII.- Frecuencia de los genotipos del CYP3A4 y CYP3A5, en una población de voluntarios sanos

Genotipo	n	Frecuencia observada	95% IC	Frecuencia esperada*
<b>CYP3A4*1B [-392A&gt;G]</b>				
CYP3A4*1A/*1A	95	0,93	0,94-1,00	0,94
CYP3A4*1A/*1B	7	0,07	0,60-1,00	0,07
CYP3A4*1B/*1B	0	0	0	0
<b>CYP3A5*3 [6986A&gt;G]</b>				
CYP3A5*1/*1	2	0,02	0,20-0,94	0,008
CYP3A5*1/*3	14	0,14	0,63-0,98	0,16
CYP3A5*3/*3	86	0,84	0,43-0,58	0,83

\*Frecuencia calculada según la Ley de equilibrio de Hardy-Weinberg. n= genotipos.

En la tabla XIV, se comparan las diferentes frecuencias alélicas CYP3A4 y CYP3A5 respecto al género, mediante el test exacto de Fisher ( $p=0,21$  para CYP3A4;  $p=0,11$  para CYP3A5), no existiendo diferencias genotípicas estadísticamente significativas entre los hombres y las mujeres.

Tabla XIV.- Frecuencia de los genotipos de CYP3A4 y CYP3A5 en mujeres (n=70) y hombres (n=32) de la población española de voluntarios sanos

Genotipo	Mujeres	Hombres
	Frecuencia (95% IC)	Frecuencia (95% IC)
<b>CYP3A4*1B [-392A&gt;G]</b>		
CYP3A4*1A/*1A	0,96 (0,95-1,00)	0,88 (0,95-1,00)
CYP3A4*1A/*1B	0,04 (0,45-1,00)	0,12 (0,72-1,00)
CYP3A4*1B/*1B	0	0
<b>CYP3A5*3 [6986A&gt;G]</b>		
CYP3A5*1/*1	0	0,06 (0,40-0,94)
CYP3A5*1/*3	0,13 (0,34-0,70)	0,16 (0,47-0,82)
CYP3A5*3/*3	0,87 (0,95-1,00)	0,78 (0,43-0,59)

En la tabla XV se especifican las diferentes combinaciones encontradas, donde cabe destacar, la presencia de dos individuos (1,9%) que fueron wild type para ambos genes, y otro grupo también formado por dos individuos que mostraron la combinación genotípica más defectuosa presente en nuestra población, siendo heterocigotos para la variante CYP3A4\*1B y presentando el genotipo CYP3A5\*3/\*3 (proteína no funcional) (tabla XV).

**Tabla XV.- Combinaciones de los genotipos CYP3A4 y CYP3A5 observados en la población española de voluntarios sanos**

CYP3A4*1B [-392A>G]	CYP3A5*3 [6986A>G]	Observado	(%)
AA	GG	84	(82)
AA	AG	9	(8,8)
AG	AG	5	(4,9)
AG	GG	2	(1,9)
AA	AA	2	(1,9)

El 71,4% de los portadores del alelo CYP3A4\*1B mostraron al menos un alelo activo de CYP3A5 en este estudio (tabla XV).

El análisis genotípico presentó una frecuencia del alelo CYP3A4\*1B (3,4%) similar a otras poblaciones cercanas tales como portugueses y otros españoles. De igual modo, la frecuencia observada para CYP3A5\*3 (91%) también coincidió con previos estudios realizados en caucásicos europeos o americanos (tabla XVI).

El genotipo homocigoto wild type CYP3A5\*1/\*1 estuvo presente en nuestra población en un 2% (tabla XVI), mientras que en la población americana-caucásica presenta un valor menor al 1% y el 0,4% para los europeos-caucásicos (Xie y cols., 2004).

**Tabla XVI.- Frecuencias alélicas de CYP3A4\*1B y CYP3A5\*3 en diferentes poblaciones. Porcentajes de individuos heterocigotos para CYP3A4\*1B y mutantes homocigotos para CYP3A5\*3 y wild type para ambos genes.**

	<b>CYP3A4*1B</b>	<b>CYP3A5*3</b>	<b>CYP3A4*1A/*1B</b>	<b>CYP3A4*1A/1A</b>	<b>Referencias</b>
			<b>CYP3A5*3/*3</b>	<b>CYP3A5*1/*1</b>	
<b>Espanoles</b>	3,4%	91%	1,9%	1,9%	
<b>(Este estudio)</b>					
<b>Caucásicos</b>					
<b>Americanos</b>	3,6-9%	90%*	<0,6%	<0,7%	(Ball y cols., 1999, Paris y cols., 1999, Walker y cols., 1998)
<b>Europeos</b>	4,5%*	93%*	0,7%	0%	(Cavaco y cols., 2003, Eap CB, 2004, Garcia-Martin y cols., 2002)
<b>Hispanos</b>	10%	63%	No determinado	No determinado	(Ball y cols., 1999, Paris y cols., 1999)
<b>Afro-</b>	53-67%	32%	5%	13%	(Ball y cols., 1999, Paris y cols., 1999, Sata y cols., 2000, Walker y cols., 1998)
<b>Americanos</b>					
<b>Asiáticos</b>	0%	60-73%	No aparecen	No aparecen	(Cavaco y cols., 2003, Lamba y cols., 2002, Walker y cols., 1998)



## 2.2.- Frecuencias alélicas del CYP2J2 en la población española

En este estudio, se analizó la presencia de cinco variantes alélicas de CYP2J2; (CYP2J2\*2, CYP2J2\*3, CYP2J2\*4, CYP2J2\*6 y CYP2J2\*7), con el fin de determinar el grado de influencia que pudieran tener sobre el fenotipo de ebastina y la presencia de dichas variantes en nuestra población. En nuestro estudio de 102 voluntarios sanos, se confirmaron estudios previos realizados, en los que las variantes alélicas CYP2J2\*2, CYP2J2\*3 y CYP2J2\*4, también estaban ausentes en caucásicos (King y cols., 2002, Pucci y cols., 2003). Del mismo modo, el alelo CYP2J2\*6 estuvo también ausente en nuestra población objeto de estudio. Dicha variante alélica no se había encontrado en africanos ni asiáticos, mientras que se había detectado en caucásicos con una frecuencia del 0,02% (King y cols., 2002). Sin embargo, un estudio más reciente realizado por Pucci y cols. (Pucci y cols., 2003), detectó que el alelo CYP2J2\*6 era muy poco frecuente entre la población caucásica (frecuencia alélica = 0,0064).

De los 102 individuos analizados, 14 fueron heterocigotos para la variante alélica CYP2J2\*7 (frecuencia alélica,  $q = 0,069$ ), siendo una frecuencia similar a la descrita anteriormente en Caucásicos (0,08) (King y cols., 2002), por el contrario, 88 individuos (86,3%) presentaron el genotipo CYP2J2\*1/\*1 (wild type), mientras que no se encontraron individuos homocigotos para esta variante alélica. Además, todas las frecuencias observadas para los genotipos CYP2J2 se encontraban en equilibrio de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=1,011$ ,  $df=2$ ,  $p=0,60$ ) (tabla XVII).

Las frecuencias alélicas CYP2J2\*1 y CYP2J2\*7 observadas en la población fueron 93,1% y 6,8%, respectivamente.

**Tabla XVII.- Frecuencia de los genotipos del CYP2J2, en una población española de voluntarios sanos.**

<b>Genotipo</b>	<b>n</b>	<b>Frecuencia observada</b>	<b>95%IC</b>	<b>Frecuencia esperada*</b>
CYP2J2*1/*1	88	0,86	0,95-1,00	0,87
CYP2J2*1/*7	14	0,14	0,34-0,69	0,13
CYP2J2*7/*7	0	0	0	0

\*Frecuencia calculada según la Ley del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los diferentes alelos mostraron una distribución muy similar entre hombres y mujeres (tabla XVIII). Ambos grupos fueron comparados mediante el test exacto de Fisher, siendo  $p=0,38$ ; por lo tanto, las diferencias entre ambos grupos, no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla XVIII.- Frecuencia de los genotipos del CYP2J2 en mujeres (n=70) y hombres (n=32) de la población española de voluntarios sanos**

<b>Genotipo</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
	<b>Frecuencia (95% IC)</b>	<b>Frecuencia (95% IC)</b>
CYP2J2*1/*1	0,88 (0,93-1,00)	0,81 (0,93-1,00)
CYP2J2*1/*7	0,12 (0,33-0,71)	0,19 (0,37-0,68)
CYP2J2*7/*7	0	0

Todos los participantes en el estudio eran de origen blanco europeo, por lo que no se realizó ningún análisis para ver la posible influencia de la raza.

Con el objetivo de analizar las posibles diferencias entre las variantes alélicas del CYP2J2, se compararon (Test exacto de Fisher) las frecuencias del alelo CYP2J2\*7, CYP2J2\*3 y CYP2J2\*4 observadas en diferentes poblaciones, con las frecuencias de la población de voluntarios sanos estudiada en el presente trabajo (tabla XIX). Como puede observarse en la tabla XIX, la frecuencia que presentaron los alelos en la población de estudio no fue diferente a las aparecidas en el resto de poblaciones de voluntarios sanos. Sí se observó una diferencia significativa entre la frecuencia del alelo CYP2J2\*7 obtenida en la presente

población de voluntarios sanos y la frecuencia presentadas por poblaciones africanas y asiáticas ( $p < 0,01$ ).

**Tabla XIX.- Diferencias en las frecuencias alélicas del gen CYP2J2 en la población española estudiada en comparación con las aparecidas en otras poblaciones.**

Población	n	Frecuencia alelos CYP2J2		
		*3	*4	Promotor *7
Española	204	0	0	0,069
Africana	96	0,02	0,04	0,17*
Asiática	96	0	0	0,13*
Caucásica blanca	96	0	0	0,08

\* $p < 0,01$ , calculadas el test exacto de Fisher. n=número de alelos. (King y cols., 2002).

### **3.-EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO CYP3A4 Y CYP2J2 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS**

---

#### **3.1.-Ratios urinarios de ebastina**

Se determinaron todos los ratios urinarios de ebastina, comentados anteriormente, para cada uno de los períodos de recogida de orina: 0 a 4, 4 a 24, y de 0-24 horas tras la ingesta de ebastina, así como una muestra aislada entre las 4 y las 5 horas.

A partir de cantidades excretadas en orina ( $\mu\text{mol}$ ) de ebastina y metabolitos, se calcularon los diferentes ratios metabólicos, dichas cantidades de cada uno de los analitos quedan representadas en la tabla XX.

Para el estudio del comportamiento metabólico, establecimos una serie de criterios de diferenciación basándonos en la influencia del sexo y diferentes factores ambientales que pudieran contribuir a la variabilidad metabólica interindividual presentada por ebastina:

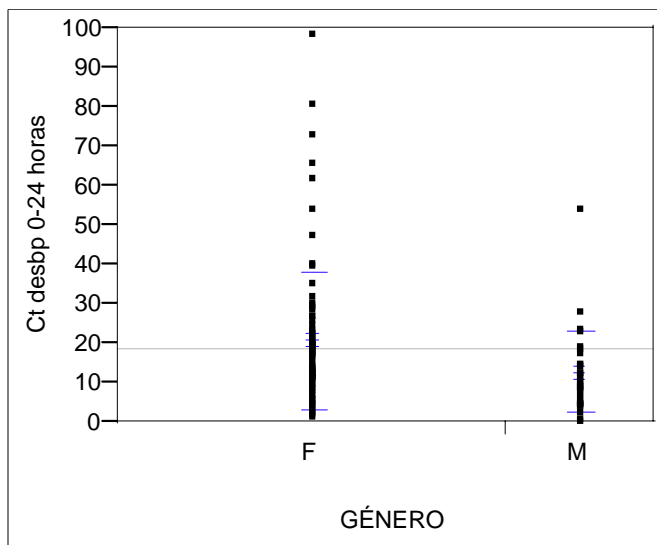
#### **3.1.1.- Diferencias sexuales**

Se obtuvieron diferencias metabólicas al comparar el grupo de las mujeres con el de los hombres, encontrando que las mujeres presentaban una mayor producción de desbutirofenona que los hombres en todos los períodos, de 0-4h, 4-24h y 0-24h; dichas diferencias fueron analizadas mediante el test de suma de rangos de Wilcoxon dando lugar a unos valores de  $p=0,0382$ ,  $0,0132$  y  $0,0018$  en los intervalos de 0-4h, 4-24h y 0-24h respectivamente (Fig. 11).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la obtención de carebastina (Fig. 12), ni ebastina. Con respecto a la eliminación del metabolito activo carebastina, dentro de todo el conjunto de la población estudiada, se produjo mayor

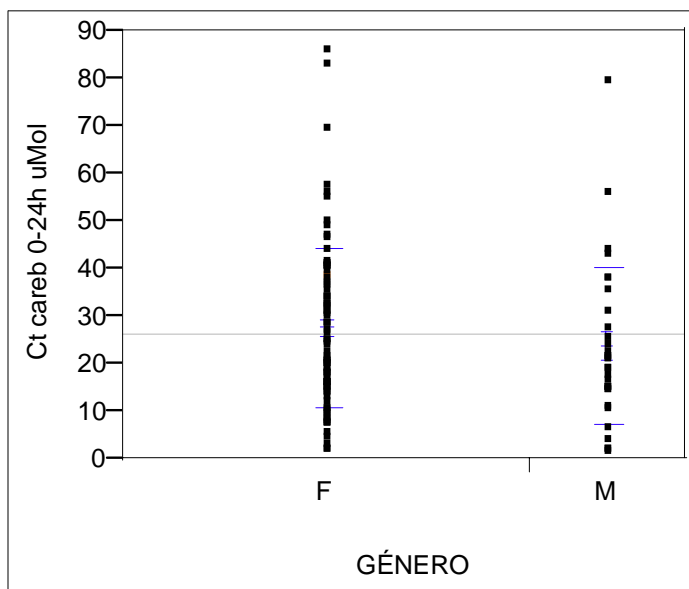
eliminación en orina [0-24horas: Media (SD), 26,1 (16,7) para carebastina frente a 18,3 (16,0) para desbutirofenona], lo cual corrobora los datos obtenidos por otros autores (Fig. 13).

**Figura 11.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 24h. (F=Mujeres; M=hombres);**  
**p<0,0018**



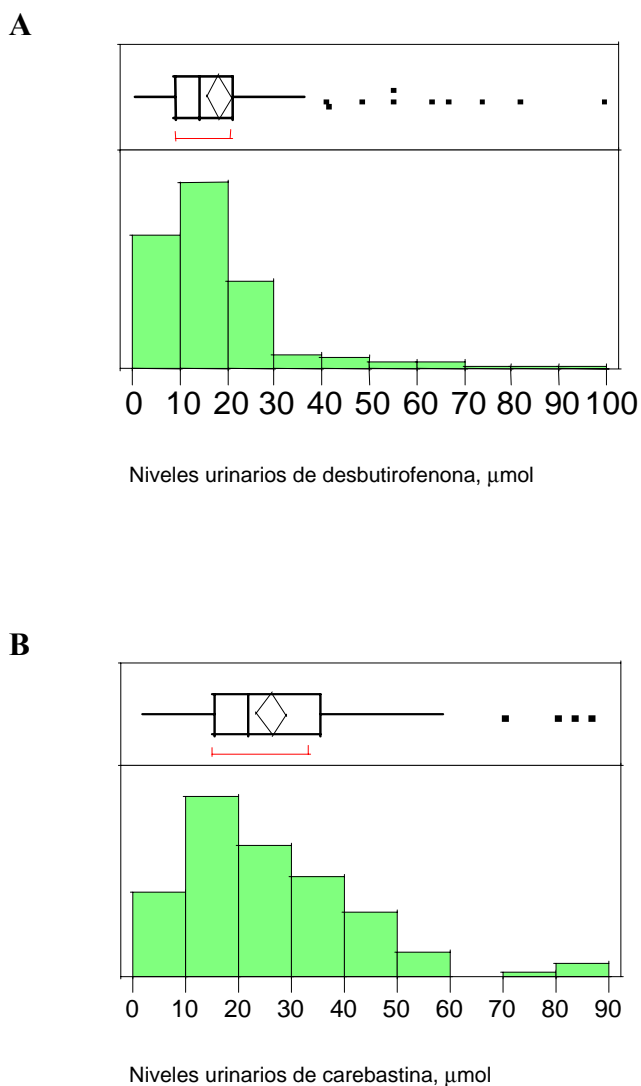
Ct=Cantidad de desbutirofenona excretada en orina en 24h ( $\mu\text{mol}$ ).

**Figura 12.- Influencia del sexo en el metabolismo de carebatina en 24h. (F=Mujeres; M=hombres);**  
**p=0,2307**



Ct=Cantidad de carebastina excretada en orina en 24h ( $\mu\text{mol}$ ).

**Figura 13. Frecuencias de distribución de niveles urinarios de desbutirofenona (A) y carebastina (B) tras la administración de una dosis oral de 20 mg de ebastina en una población caucásica de 116 voluntarios sanos.**



### 3.1.2.- Tabaco

No se observó ninguna relación entre el consumo de tabaco y los datos urinarios obtenidos en esta población de voluntarios sanos (tabla XX).

Para descartar un posible factor de confusión, se compararon fumadores por un lado y no fumadores por otro, obteniendo diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo de

los no fumadores, siendo las mujeres no fumadoras, las que presentaban mayores niveles urinarios de desbutirofenona en todos los períodos (0-4h  $p=0,033$ ; 4-24h  $p=0,0029$ ; 0-24h  $p=0,0010$ ).

**Tabla XX.- Análisis de la influencia del sexo y el tabaco en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 116 voluntarios sanos, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.**

	Hombres		Mujeres	
	No fumadores (n=30)	Fumadores (n=4)	No fumadoras(n=59)	Fumadoras(n=23)
Desbp (0-4h)	1,4 (1,2)	0,8 (0,6)	4,1 (10,3)*	1,7 (1,3)
Desbp (4-24h)	11,1 (9,8)	14,9 (12,6)	18,9 (15,9)**	12,6 (7,1)
Desbp (0-24h)	12,1 (10,1)	15,7 (12,3)	23,2 (19,8)**	14,7 (7,12)
Careb (0-4h)	3,3 (3,4)	2,7 (4,4)	4,3 (5,2)	3,5 (3,5)
Careb (4-24h)	21,0 (14,2)	14,2 (8,5)	22,9 (14)	24,2 (16,1)
Careb (0-24h)	24,6 (17,1)	16,9 (12,0)	27,6 (16,3)	27,5 (18,6)
EBT (0-4h) <sup>Ψ</sup>	1,6 (2,7)	1,2 (0,9)	3,6 (7,5)	1,5 (2,2)
EBT (4-24h) <sup>Ψ</sup>	11,1 (21,1)	2,4 (1,2)	8,3 (20,9)	4,5 (4,6)
EBT (0-24h) <sup>Ψ</sup>	13,4 (22,0)	3,6 (2,1)	12,0 (22,0)	6,0 (5,0)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona; Careb= carebastina; EBT= ebastina.

\* $p<0.05$  (test de suma de rangos de *Wilcoxon*), obtenido cuando se comparan fumadores y no fumadores (mujeres).

\*\* $p<0.005$  (test de suma de rangos de *Wilcoxon*), obtenido al comparar hombres no fumadores/mujeres no fumadoras.

<sup>Ψ</sup> $\mu\text{mol} \times 10^{-3}$ .

Los niveles urinarios de metabolitos (desbutirofenona y carebastina), mostraron una gran variabilidad interindividual en la población estudiada, el 95% de los valores obtenidos para desbutirofenona, presentaron un rango de variación de hasta 60 veces (0,9 – 54,9  $\mu\text{mol}$ ), mientras que los valores de carebastina presentaron una variabilidad más baja, siendo el rango de variación del 93% de los valores, 19 (2,4 – 44,8  $\mu\text{mol}$ ).

#### **4.- INFLUENCIA DEL ZUMO DE POMELO EN EL METABOLISMO DE EBASTINA**

---

##### **4.1.- Análisis de ebastina y metabolitos en orina**

Se analizaron ebastina y sus metabolitos en orina, tras la ingesta de zumo de pomelo durante tres días consecutivos, recogiendo posteriormente muestras de orina en intervalos de 0 a 4 horas y de 4 a 24 horas, así como una muestra aislada entre las 4 y 5 horas.

Las características de la técnica completa (coeficientes de recuperación, coeficientes de variación intra-día, inter-día, curvas de calibración, etc.), quedan reflejados en el apartado anterior 1 de Resultados.

Se empleó zumo de pomelo, para probar así la inhibición de CYP3A y poder evaluar las posibles diferencias interindividuales, así pues, los valores correspondientes a ebastina y sus metabolitos eliminados en orina, quedan reflejados en la tabla XXI, donde aparecen las cantidades excretadas diferenciadas por género, cuando ebastina se ingiere con agua o con zumo de pomelo.

La inhibición metabólica, tal y como se esperaba con el zumo de pomelo se produce de forma concreta sobre la ruta mediada por CYP3A, experimentándose un descenso de desbutirofenona cuando se administra ebastina con zumo de pomelo. La figura 14, refleja las variaciones metabólicas de los dos metabolitos principales de ebastina, desbutirofenona y carebastina, en los distintos períodos de tiempo (0-4h, 4-24h y 0-24h). Los valores obtenidos en los intervalos de 4-24h y de 0-24h fueron ( $15,9 \pm 14,6$ ,  $p=0,0364$ ) y ( $18,6 \pm 15,6$ ,  $p=0,0092$ ) respectivamente dentro de todo el conjunto de voluntarios, siendo estadísticamente significativos.



**Tabla XXI.- Análisis de la influencia del sexo en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 62 voluntarios sanos, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral con zumo de pomelo. (Basal: ingesta de ebastina con agua).**

	Hombres (n=15)		Mujeres (n=47)	
	Basal	Zumo de pomelo	Basal	Zumo de pomelo
Desbp (0-4h)	1,27 (0,89)	1,65 (1,5)	5,3 (12,2)	3,20 (3,5)
Desbp (4-24h)	15,3 (13,5)	12,4 (14,1)	21,5 (16,7)	17,1 (14,7)*
Desbp (0-24h)	14,9 (14,6)	13,6 (14,,3)	26,6 (20,9)	20,1 (15,8)**
Careb (0-4h)	2,4 (2,4)	2,8 (2,1)	3,9 (5,4)	4,7 (4,6)
Careb (4-24h)	16,3 (9,9)	20,3 (15,7)	20,3 (13)	19,2 (11,2)
Careb (0-24h)	18,4 (11,1)	25,4 (17,0)	24,1 (15,1)	24,2(13,4)
EBT (0-4h) <sup>Ψ</sup>	1,2 (1,3)	8,5 (13,9)	2,3 (4,0)	4,5 (8,7)
EBT (4-24h) <sup>Ψ</sup>	13,3 (23,0)	19,8 (50)	9,7 (23)	8,8 (27)
EBT (0-24h) <sup>Ψ</sup>	14,4 (23)	33,6 (70)	12,3 (23,6)	13,7 (36,2)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona; Careb= carebastina; EBT= ebastina.

\*p=0,025: \*\*p=0,0062 (test de muestras pareadas, *Wilcoxon signed rank test*) obtenido cuando se comparan según el género, cantidades excretadas de analitos. <sup>Ψ</sup>  $\mu\text{mol} \times 10^{-3}$

A partir de los resultados anteriormente obtenidos, como se puede observar en la figura 15, vimos, que la inhibición de la ruta mediada por CYP3A era estadísticamente significativa en el grupo de las mujeres. Por lo tanto, a continuación establecimos las diferencias metabólicas en hombres y mujeres descartando el hábito tabáquico, posible elemento de confusión. Los datos obtenidos quedan reflejados en la tabla XXII.

**Figura 14. Eliminación urinaria de desbutirofenona y carebastina en estado basal y durante la ingesta de zumo de pomelo. (Basal: ingesta de ebastina con agua).**

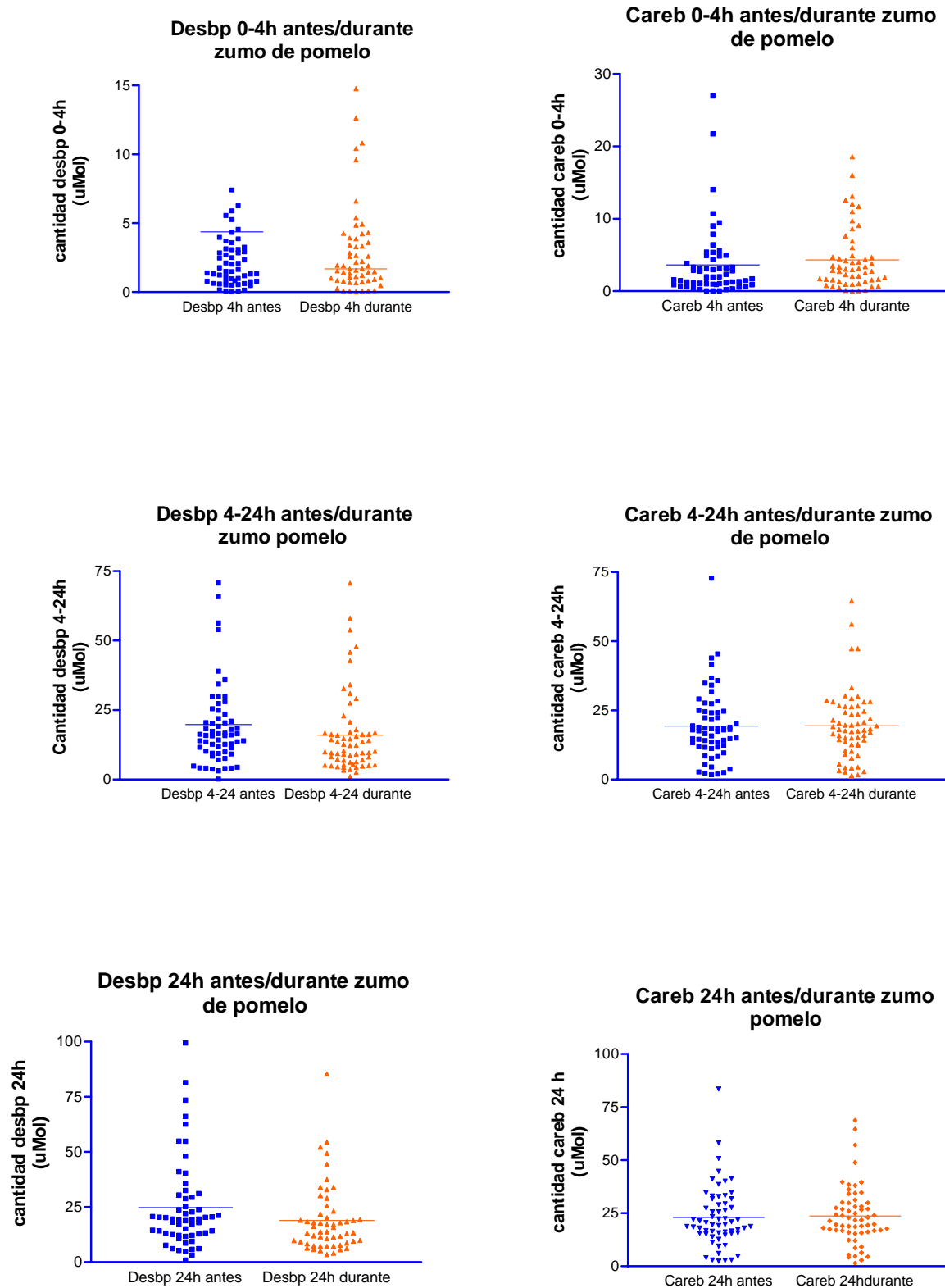
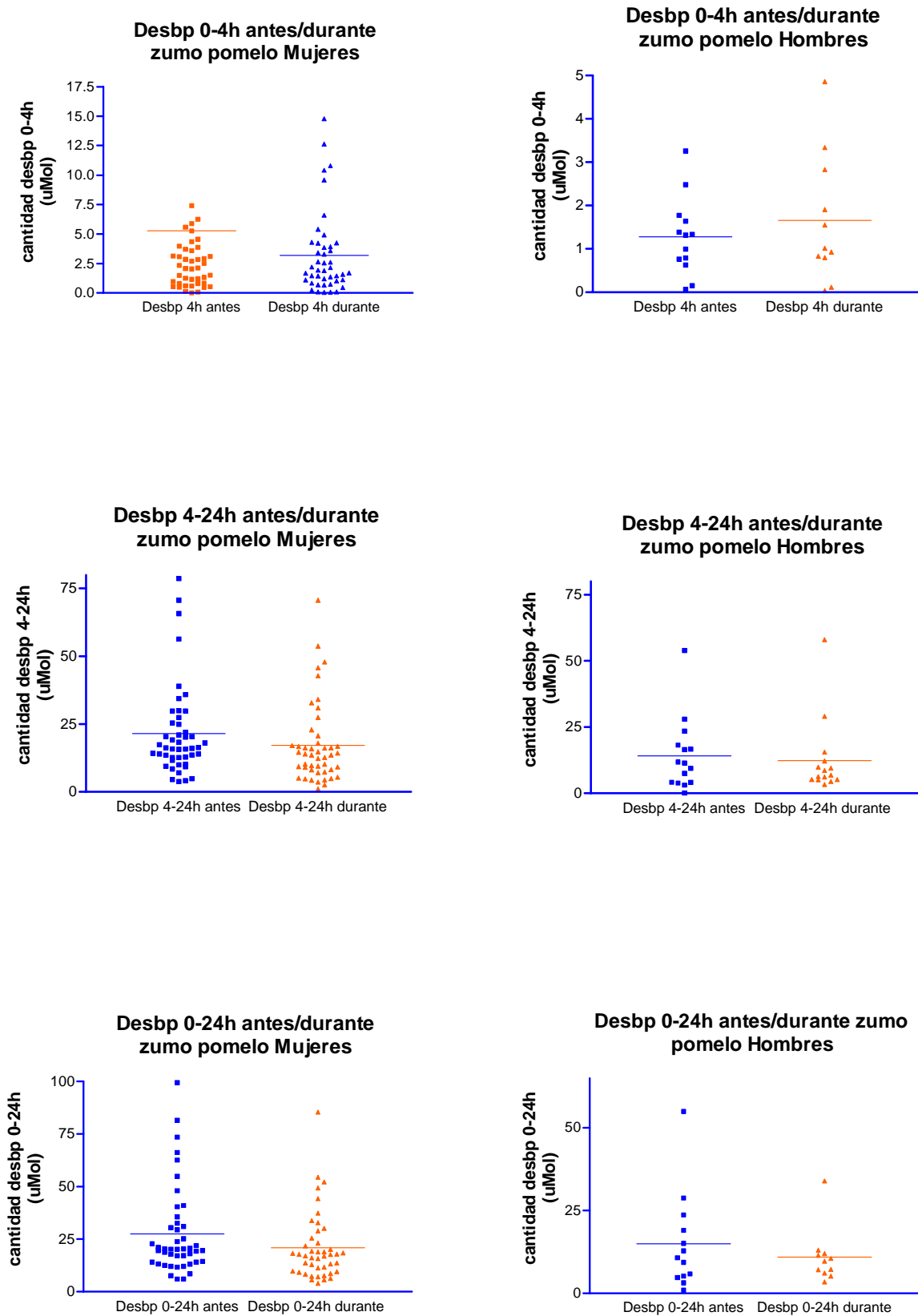


Figura 15. Eliminación urinaria de desbutirofenona basal y durante la ingesta de zumo de pomelo en hombres y mujeres. (Basal: ingesta de ebastina con agua).



**Tabla XXII.- Eliminación urinaria de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en una población de 46 voluntarios sanos no fumadores, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT en estado basal y con zumo de pomelo.**

	Hombres no fumadores (n=9)		Mujeres no fumadoras (n=37)	
	Basal	Zumo de pomelo	Basal	Zumo de pomelo
Desbp (0-4h)	1,48 (0,94)	1,53 (1,10)	6,02 (13,6)	3,1 (3,5)
Desbp (4-24h)	13,9 (14,5)	8,19 (3,4)	23,8 (17,8)	18,7 (14,9)*
Desbp (0-24h)	15,1 (14,5)	9,3 (3,5)	29,7 (22,3)	21,8 (16,3)*
Careb (0-4h)	2,2 (1,2)	2,6 (2,3)	3,93 (5,7)	4,26 (4,04)
Careb (4-24h)	17,1 (10,6)	21,6 (16,9)	19,8 (13,5)	19,7 (12,4)
Careb (0-24h)	18,9 (11,3)	25,6 (19,4)	23,7 (15,3)	24,4 (14,2)
EBT (0-4h) <sup>Ψ</sup>	1,2 (1,5)	8,8 (15,2)	2,6 (4,4)	4,5 (9,3)
EBT (4-24h) <sup>Ψ</sup>	17,0 (26,0)	26 (58)	11,1 (26)	10 (31)
EBT (0-24h) <sup>Ψ</sup>	18,3 (27)	42,2 (81)	13,7 (26)	14,8 (40)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona; Careb= carebastina; EBT= ebastina.

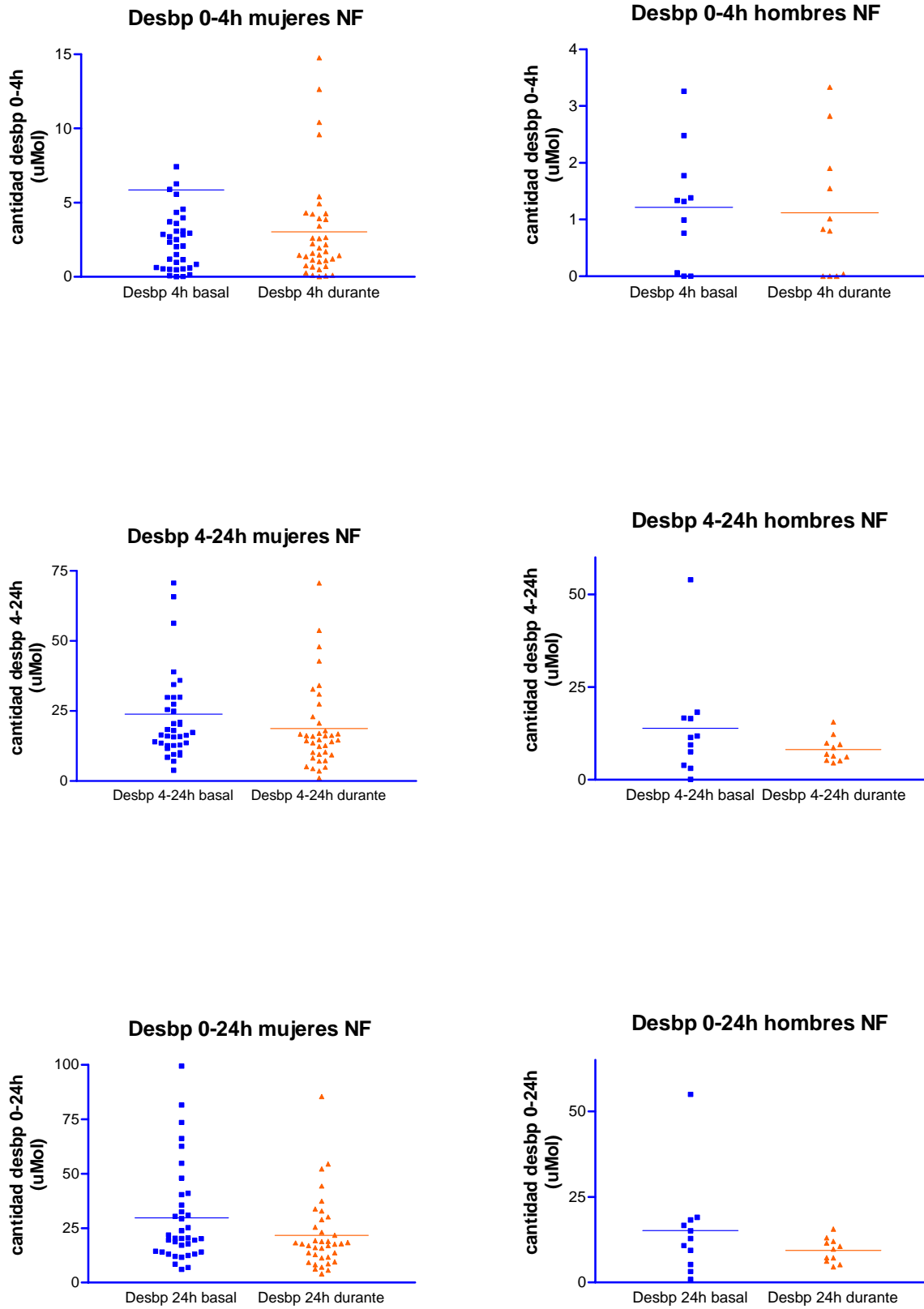
\* $p < 0,05$ , (test de muestras pareadas, *Wilcoxon signed rank test*) obtenido en cuando se comparan cantidades urinarias de desbutirofenona en hombres o en mujeres. <sup>Ψ</sup>  $\mu\text{mol} \times 10^{-3}$

La figura 16 muestra las diferencias en la eliminación de desbutirofenona, siendo estadísticamente significativas en el grupo de las mujeres en los períodos de 4-24h y de 0-24h respectivamente. (Se aplicó el test de muestras pareadas, *Wilcoxon signed rank test*).

#### 4.2-Índice de inhibición metabólica

El índice de inhibición metabólica, es un parámetro que representa cuántas veces se inhibe un sustrato. En nuestro caso, hemos empleado este parámetro que resulta ser el cociente de dividir metabolito basal por el metabolito en las nuevas condiciones (zumo pomelo).

Figura 16. Eliminación urinaria de desbutirofenona basal y con zumo de pomelo de hombres y mujeres no fumadores. (NF: no fumadores).



Dicho índice, nos permite comparar no solo los valores basales con los actuales; al ser un cociente, nos permite establecer diferencias interpoblacionales, pudiendo hacer una estimación correcta.

Una vez determinadas las diferencias sobre el metabolito desbutirofenona, pasamos a describir los valores metabólicos donde se presenta la inhibición.

Los datos de los parámetros de inhibición para desbutirofenona, dentro de la población estudiada aparecen en la tabla XXIII.

**Tabla XXIII.- Comparación del índice metabólico de inhibición entre hombres y mujeres no fumadores.**

	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>
	<b>No fumadores (n=9)</b>	<b>No fumadoras (n=37)</b>
Desbp (0-4h)	0,96 (0,04)	1,94 (2,1)*
Desbp (4-24h)	1,70 (4,0)	1,27 (3,6)
Desbp (0-24h)	1,62 (4,1)	1,36 (5,6)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona.

\* $p < 0,05$  (test de suma de rangos de *Wilcoxon*) obtenido al comparar hombres y mujeres

Tras la administración de zumo de pomelo, varios individuos presentaron somnolencia moderada, siendo dicha variación significativa, mediante el test exacto de Fisher ( $p=0.0167$ ), con respecto a los valores basales sin zumo de pomelo.

## 5.- ESTUDIO CORRELACIONAL ENTRE EL GENOTIPO Y EL METABOLISMO DE EBASTINA

---

### 5.1- Influencia del genotipo sobre el metabolismo de ebastina

Se estudiaron las cantidades de ebastina y metabolitos eliminados en orina, en los períodos de 0 a 4 horas y de 4 a 24 horas, en los 89 voluntarios sanos genotipados que recibieron una dosis única de 20 mg de ebastina.

Los datos correspondientes a las cantidades ( $\mu\text{mol}$ ) de los distintos metabolitos correspondientes a los 89 voluntarios genotipados aparecen en la tabla XXIV.

Para el estudio del comportamiento metabólico, establecimos los mismos criterios de diferenciación que en apartado 3.1 de Resultados, de tal modo que la variabilidad presentada fue la siguiente:

**5.1.1- Diferencias sexuales:** Aplicando el test de rangos de datos de Wilcoxon, encontramos mayor producción de desbutirofenona en las mujeres que en los hombres en 4-24h y de 0-24h siendo los coeficientes  $p=0,0012$  y  $p=0,0007$  respectivamente (Fig. 17 y 18).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la obtención de carebastina, ni ebastina.

**5.1.2.- Tabaco:** Las mujeres no fumadoras presentaron niveles de desbutirofenona superiores a las mujeres fumadoras en el período de 0 a 4 h, sin ser dicha diferencia estadísticamente significativa (test de suma de rangos de Wilcoxon; para desbutirofenona de 0-4h el valor de  $p<0,90$ ), siendo dicha diferencia significativa de 4-24h y de 0-24h ( $p<0,05$ ) entre mujeres no fumadoras y mujeres fumadoras.

**Tabla XXIV.-Análisis de la influencia del sexo y el tabaco en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en la población de 89 voluntarios sanos genotipados, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.**

	HOMBRES		MUJERES	
	No fumadores (n=22)	Fumadores (n=4)	No fumadoras (n=48)	Fumadoras (n=15)
Desbp 0-4	1,46 (1,12)	0,80 (0,62)	5,02 (12,1)	2,0 (1,3)
Desbp 4-24h	10,5 (10,9)	14,9 (12,6)	20,5 (17,2)**	13,24 (7,27)*
Desbp 0-24h	11,8 (11,0)	15,8 (12,3)	25,5 (21,5)**	15,2 (7,4)
Careb 0-4h	2,45 (1,6)	2,8 (4,5)	4,05 (5,4)	3,7 (3,9)
Careb 4-24h	17,1 (9,7)	14,2 (8,5)	21,7 (14,4)	25,8 (18,4)
Careb 0-24h	19,4 (10,0)	16,9 (12,0)	25,67 (16,3)	29,2 (21,3)
EBT 0-4h	1,7 (3,2) <sup>ψ</sup>	1,2 (0,9) <sup>ψ</sup>	2,60 (1,2) <sup>ψ</sup>	1,8 (2,6) <sup>ψ</sup>
EBT 4-24H	13,8 (24,1) <sup>ψ</sup>	2,4 (1,2) <sup>ψ</sup>	9,3 (23,0) <sup>ψ</sup>	4,3 (4,2) <sup>ψ</sup>
EBT 0-24H	15,4 (24,6) <sup>ψ</sup>	3,6 (2,1) <sup>ψ</sup>	11,9 (23,2) <sup>ψ</sup>	6,1 (4,9) <sup>ψ</sup>

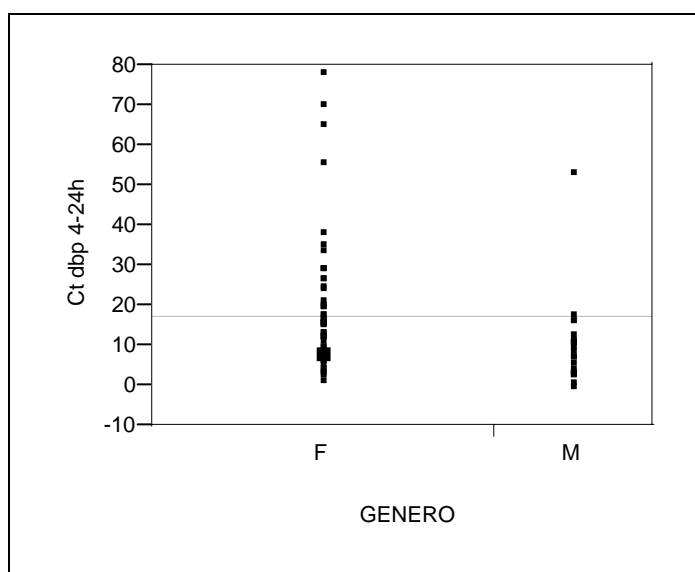
Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona; Careb= carebastina; EBT= ebastina.

\* $p < 0,05$  (Test de suma de rangos de Wilcoxon) obtenido cuando se comparan fumadores y no fumadores (mujeres).

\*\* $p < 0,005$  (Test de suma de rangos de Wilcoxon) cuando se comparan hombres no fumadores/mujeres no fumadoras.

<sup>ψ</sup> $\times 10^3$

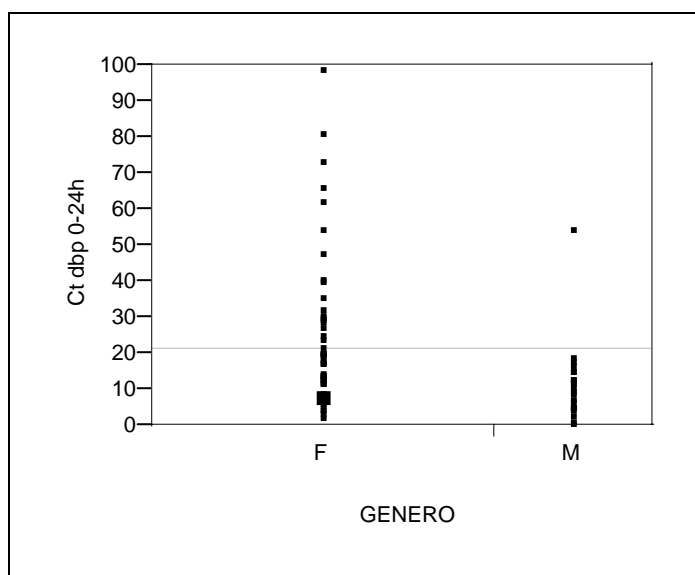
**Figura 17.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 4-24h. (F=Mujeres; M=Hombres)  $p < 0,0012$**



Ct= Cantidad de desbutirofenona excretada en orina en el intervalo 4-24h ( $\mu\text{mol}$ ).



**Figura 18.- Influencia del sexo en el metabolismo de desbutirofenona 0-24h. (F=Mujeres; M=Hombres)  $p<0,0007$ .**



Ct= Cantidad de desbutirofenona excretada en 24 horas ( $\mu\text{mol}$ ).

Una vez obtenido el fenotipo de cada uno de los voluntarios sanos, se establecieron subgrupos en función de los genotipos CYP3A4\*1B, CYP3A5\*3 y CYP2J2\*7 presentados.

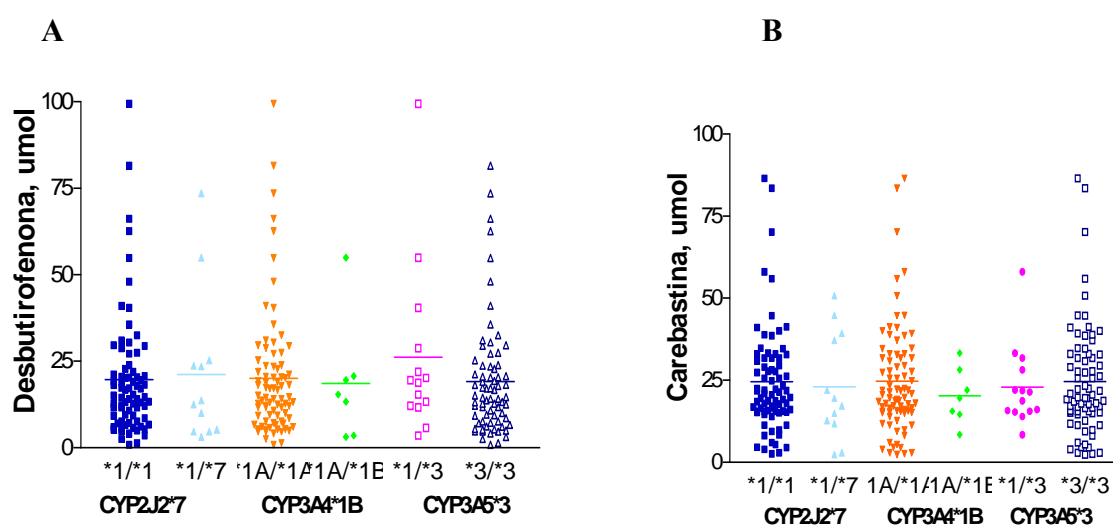
No hubo asociaciones evidentes entre los niveles de desbutirofenona o carebastina y las variantes alélicas CYP3A4\*1B o CYP2J2\*7 en los períodos de tiempo estudiados (tabla XXV, Fig. 19). La extraña aparición de portadores homocigotos (wild type) de CYP3A5\*1 en una población caucásica (2 sujetos en este estudio), excluyó el análisis estadístico de la comparación fenotípica con respecto a los individuos CYP3A5\*3/\*3. Por otro lado, los individuos heterocigotos para la variante CYP3A5\*3 presentaron niveles de desbutirofenona, un 35% más elevados que lo portadores de CYP3A5\*3/\*3 [0-24 horas: media (SD), 26,1 (25,1) frente a 19,1 (16,5)] (tabla XXV, Fig. 19), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la variabilidad en los datos y por ello, no podemos confirmar los efectos de la dosis sobre el gen.

Tabla XXV.- Análisis de la influencia del genotipo en las cantidades urinarias de ebastina y metabolitos ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en la población de 89 voluntarios sanos genotipados, en diferentes intervalos de tiempo tras la ingesta de 20 mg de EBT oral.

Genotipo	CYP3A4*1B		CYP3A5*3			CYP2J2*7	
	AA	AG	AA	AG	GG	GG	GT
N	82	7	2	14	73	77	12
<b>DESBP</b>							
0-4h	3,7 (9,5)	1,44 (1,24)	0,55 (0,17)	7,2 (19,4)	2,8 (5,2)	3,7 (9,8)	2,1 (2,1)
4-24h	16,5 (14,7)	17,2 (17,3)	5,5 (0,8)	18,9 (13,5)	16,4 (15,2)	16,2 (13,6)	19,2 (21,8)
0-24h	20,0 (18,3)	18,7 (17,5)	6,0 (0,9)	26,1 (25,1)	19,1 (16,5)	19,7 (17,6)	21,2 (21,9)
<b>CAREB</b>							
0-4h	3,6 (4,7)	3,3 (2,16)	2,60 (2,4)	4,3 (4,1)	3,4 (4,6)	3,62 (4,6)	3,17 (3,8)
4-24h	21,3 (14,6)	16,9 (6,8)	20,8 (0,3)	18,6 (9,1)	21,4 (15,1)	21,1 (14,2)	19,8 (14,4)
0-24h	24,7 (16,5)	20,3 (8,5)	23,4 (2,1)	22,9 (12,3)	24,6 (16,9)	24,5 (16,1)	22,9 (16,2)
<b>EBT</b>							
0-4h <sup>ψ</sup>	2,3 (3,7)	0,9 (0,6)	0,7 (0,5)	2,5 (3,5)	2,2 (3,7)	2,3 (3,8)	1,6 (1,8)
4-24h <sup>ψ</sup>	9,9 (21,7)	2,2 (1,4)	40,6 (54,7)	5,1 (6,5)	9,2 (21,3)	8,9 (21,7)	11,8 (15,4)
0-24h <sup>ψ</sup>	12,5 (22,2)	3,1 (1,9)	41,3 (55,2)	7,6 (7,9)	11,7 (21,9)	11,4 (22,3)	13,4 (15,5)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. Desbp= desbutirofenona; Careb= carebastina; EBT= ebastina.  $^{\psi}\times 10^{-3}$

Figura 19. Asociación genotipo-fenotipo entre los niveles urinarios de desbutirofenona (A) y carebastina (B) y CYP2J2\*7, CYP3A4\*1B y CYP3A5\*3. Se muestran los valores totales en 24 horas.



## 5.2.-Influencia del genotipo en el metabolismo de ebastina y zumo de pomelo

Se estudiaron las cantidades de ebastina y metabolitos eliminados en orina, en los períodos de 0 a 4 h, 4 a 24 h y 0-24h, en los 61 voluntarios sanos genotipados (procedentes del grupo anterior) que recibieron una dosis única de 20 mg de ebastina tras la administración de zumo de pomelo durante tres días consecutivos (procedimiento exacto al que se describe en el apartado 4.3.3 de Material y Método).

Se comparó el metabolismo basal de ebastina con el metabolismo de dicho fármaco cuando se administraba concomitantemente con zumo de pomelo y se asoció al genotipo presentado por cada individuo, para ver así, posibles variaciones metabólicas que pudieran estar provocadas por alguna mutación en alguno de los genes implicados, de tal manera que ello pudiera afectar de forma directa o indirecta al enzima y por consiguiente a su actividad (tabla XXVI).

**Tabla XXVI.- Datos metabólicos de ebastina y sus metabolitos en estado basal y durante la ingesta del zumo de pomelo.**

<b>N=61</b>	<b>BASAL</b>	<b>ZUMO DE POMELO</b>
DESBP 0-4H	4,4 (10,9)	2,90 (3,3)
DESBP 4-24H	19,8 (16,3)	16,1 (14,7)*
DESBP 0-24H	23,9 (20,0)	18,7 (15,7)*
CAREB 0-4H	3,7 (4,9)	4,4 (4,3)
CAREB 4-24H	19,6 (12,3)	19,8 (12,2)
CAREB 0-24H	23,0 (14,3)	23,7 (13,7)
EBT 0-4H	2,2(3,6)	5,4 (10,0)
EBT 4-24H	10,7 (23,2)	11,6 (34,8)
EBT 0-24H	12,9 (23,0)	16,4 (42,9)

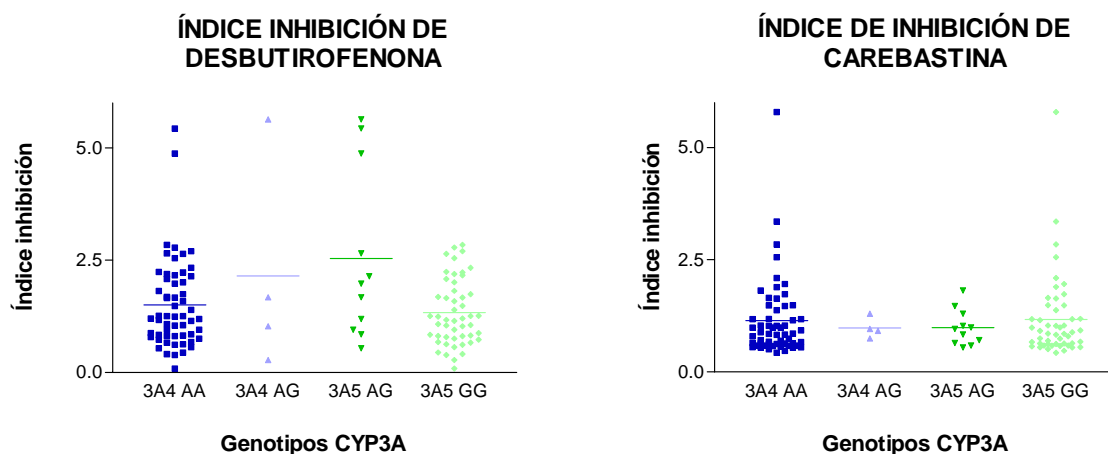
Los datos están expresados en media  $\pm$  DS.

\* $p < 0,05$  (test de muestras pareadas, *Wilcoxon signed rank test*) obtenido cuando se comparan niveles excretados de metabolitos en estado basal y con zumo de pomelo.

Los niveles de desbutirofenona descendieron notablemente tras la ingesta de zumo, ello corresponde a la inhibición metabólica del CYP3A (enzima implicado en la ruta de desbutirofenona). Una vez comprobada la inhibición, decidimos establecer un nuevo criterio diferencial basado en los genotipos correspondientes.

Para poder establecer de forma adecuada una medida de estimación de la inhibición, se procedió al cálculo del índice de inhibición (fold inhibition), que resulta ser el cociente de dividir metabolito basal por el metabolito en las nuevas condiciones (zumo pomelo) y representa cuántas veces se inhibe un sustrato. Se asoció el índice de inhibición con cada variante alélica tanto para desbutirofenona como para carebastina y se obtuvieron los resultados que quedan representados en la figura siguiente (Fig.20):

**Figura 20.- Índice de inhibición metabólica para los metabolitos desbutirofenona y carebastina en los 61 voluntarios sanos con diferentes genotipos CYP3A.**



Los índices no variaron para carebastina, pero sí variaron para desbutirofenona, siendo más elevados para las variantes alélicas heterocigotas que para los homocigotos mutantes o wild type.

En la tabla XXVII, se agrupan los índices de inhibición metabólica del grupo de voluntarios sanos para las variantes de CYP3A. Puede observarse cómo la media del índice de inhibición metabólico (dbp/dbp zumo) de los individuos CYP3A5\*1/\*3 (n=11) fue considerablemente más alta que los del resto, junto a CYP3A4\*1A/\*1B, que debido al pequeño tamaño de la muestra, tan solo 4 individuos, no podemos considerar los resultados estadísticos.

**Tabla XXVII.- Índices metabólicos inhibitorios de desbutirofenona en 61 voluntarios sanos con diferente genotipo CYP3A.**

<b>Genotipo</b>	<b>n</b>	<b>Índice inhibición</b>
CYP3A4*1A/*1A	57	1,5 (1,0)
CYP3A4*1A/*1B	4	2,15 (2,4)
CYP3A5*1/*3	11	2,5 (1,9)
CYP3A5*3/*3	50	1,33 (0,73)*

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS. \*p<0,05 (test de suma de rangos de *Wilcoxon*)

En la tabla XXVIII se especifican las diferentes combinaciones encontradas, donde cabe destacar, la presencia de dos individuos (3,2%) que fueron mutantes para ambos genes (CYP3A4\*1A/\*1B; CYP3A5\*3/\*3) presentando el valor del índice más bajo, y dos individuos parcialmente mutados (CYP3A4\*1A/\*1B; CYP3A5\*1/\*3) para los dos genes, con el valor más alto del índice.

**Tabla XXVIII.-Combinaciones de los genotipos CYP3A4 y CYP3A5 observados en la población de voluntarios sanos (n=62).**

<b>CYP3A4*1B</b>	<b>CYP3A5*3</b>	<b>Observado</b>	<b>(%)</b>	<b>Indice inhibición</b>
AA	AG	9	(14,7)	2,3 (1,9)
AG	AG	2	(3,2)	3,7 (2,8)
AA	GG	48	(78,7)	1,36 (0,7)
AG	GG	2	(3,2)	0,65 (0,5)

Los datos están expresados en media  $\pm$ DS.

De hecho, al tener uno de los dos genes activos, efectivamente se produce la inhibición con zumo de pomelo (62% de los individuos) tal y como queda representado en la figura 20.

## **DISCUSIÓN**

La extensa variabilidad en el metabolismo de fármacos es el factor más relevante a la hora de establecer una terapia farmacológica a nivel individual. A lo largo de los últimos 35 años, se han hecho esfuerzos para identificar las bases de tal variabilidad. Dichos esfuerzos, han logrado con éxito establecer determinantes fisiológicos, ambientales, y patológicos. Recientemente, el interés se ha centrado en posibles factores genéticos, especialmente el conocimiento de las enzimas metabolizadoras de fármacos se ha incrementado con el reconocimiento de las variaciones en las secuencias de los genes involucrados, las cuales pueden ser las responsables de las variaciones funcionales.

Actualmente, muchas investigaciones, van dirigidas al estudio de la subfamilia CYP3A, posiblemente, el grupo de enzimas metabolizadoras de fármacos más importantes presentes en humanos. Numerosos SNPs, han sido identificados tanto en CYP3A4 como CYP3A5. Muchos de estos polimorfismos sin embargo, son muy poco frecuentes, o aparecen de forma muy selectiva en ciertos grupos poblacionales, por ello, es poco probable que muchos de estos polimorfismos, sean responsables de la elevada variabilidad interindividual encontrada en el metabolismo de fármacos de forma generalizada. Es de interés especial para los investigadores, poder conocer de forma exacta las localizaciones de éstas isoformas.

Por otro lado, es importante destacar, que aunque los estudios de asociación genotípica-fenotípica son relativamente simples, existen muchas dificultades y problemas que los investigadores pueden llegar a ignorar. Seleccionar una población lo suficientemente grande, el cálculo adecuado de los análisis estadísticos y las bases genotípicas y fenotípicas adecuadas entre otros, son elementos críticos para poder confiar en la asociación obtenida. A veces, contamos con errores falsos negativos o falsos positivos que pueden desviarnos de la investigación.



## **1.- VALORACIÓN DEL MÉTODO DE EBASTINA PARA EL ESTUDIO DE DETERMINACIÓN METABÓLICA**

---

Las enzimas pertenecientes a la subfamilia CYP3A están implicadas en el metabolismo de gran cantidad de medicamentos y de agentes medioambientales potencialmente tóxicos, así como gran cantidad de compuestos endógenos como las hormonas. Existe una marcada heterogenicidad interindividual en la expresión de los genes CYP3A. Aquellos individuos con una actividad CYP3A inusualmente elevada o viceversa, podrían sufrir mayores riesgos de ineffectividad terapéutica o por el contrario de respuestas tóxicas a muchas medicaciones comúnmente empleadas, y sufrir el riesgo de padecer ciertas enfermedades provocadas por agentes ambientales.

Sin embargo, las verdaderas implicaciones de que ciertos individuos posean una actividad CYP3A mayor o menor, es algo aún bastante desconocido. La falta de progreso en este área, refleja en parte la dificultad de cuantificar la actividad enzimática CYP3A in vivo. Es posible llevar a cabo biopsias hepáticas o intestinales, pero éstos, son procedimientos invasivos impracticables y poco éticos en la mayoría de los casos.

Nuestro propósito inicial fue el desarrollo de un test con el fin de determinar la actividad CYP3A basándonos en el metabolismo de compuestos cuidadosamente seleccionados. Nuestro objetivo se basó en el desarrollo de una prueba no invasiva, aunque no podíamos descartar el empleo de técnicas mínimamente invasivas como es el caso de la recolección de muestras de sangre.

### 1.1.- Consideraciones generales

Es obvio que toda prueba debe ser segura. Con respecto a este criterio, la prueba ideal sería la determinación de la actividad CYP3A en compuestos endógenos, tales como las hormonas, a través de la excrección urinaria.

Un segundo criterio esencial, es que el enzima de interés, sea el enzima exclusivo de la ruta catalítica que estamos considerando. La demostración de la participación de un enzima en una determinada ruta catalítica, se lleva a cabo mediante estudios de inhibición in vitro con microsomas hepáticos, empleando sustratos que inhiben específicamente al enzima de interés. Es importante considerar, o al menos demostrar, que el enzima cataliza al sustrato de forma exclusiva a nivel de microsomas hepáticos, con lo cual la prueba propuesta, puede que no sea útil en un test in vivo.

Está claro, que el diseño de una prueba específica del CYP3A dependerá en parte del objetivo final del test. Si el fin es determinar la actividad hepática CYP3A, la administración oral podría ser problemática debido a un significativo metabolismo intestinal. Si por el contrario el propósito final de la prueba es predecir el aclaramiento oral de sustratos de CYP3A, la administración oral de la prueba puede que sea la ruta ideal.

Por otra parte, resulta muy complejo saber si una ruta metabólica está afectada tan solo por el CYP3A4 o si por el contrario, también participa el CYP3A5.

A lo largo del tiempo se han propuesto diferentes pruebas para medir la actividad CYP3A como las que se citan a continuación:

- 1.- Test del aliento para eritromicina
- 2.- Test de aclaramiento de midazolam
- 3.- Determinación del ratio urinario  $6\beta$  hidroxycortisol/cortisol en orina

4.- Test de nifedipino

5.- Test del ratio urinario de dapsona

Todas las pruebas son razonablemente seguras, especialmente la prueba del cortisol por implicar tan solo la recolección de orina.

Nosotros hemos centrado nuestra investigación en poder conseguir un método sencillo y asequible para evaluar la actividad del CYP3A en orina, mediante el uso de diversas técnicas de LC/MS, administrando una dosis relativamente baja (20mg) de ebastina a la población. Con estas dosis se obtienen patrones adecuados de eliminación y se evitan posibles efectos secundarios indeseables en los sujetos.

Ensayos clínicos anteriores a nuestro estudio, habían demostrado que ebastina, administrada a dosis 5 veces superiores a la dosis terapéutica recomendada, no causaba cambios clínicamente relevantes en el intervalo QTc (Gillen y cols., 2001).

También se había estudiado la interacción de ebastina con ketoconazol y eritromicina (ambos compuestos producen un incremento del intervalo QTc). Dicha interacción dio lugar a un incremento en los niveles plasmáticos de ebastina, con el consiguiente incremento del intervalo QTc. También se había demostrado, que cuando se empleaba ebastina junto a comida, tanto los niveles plasmáticos como el área bajo la curva AUC incrementaban entre 1,5 a 2 veces, esto nos condujo a administrar ebastina tras la ingesta de alimentos.

## 1.2.- Técnicas de determinación de ebastina

### 1.2.1- *Análisis de ebastina y metabolitos en orina*

La técnica de LC/MS empleada para el análisis urinario de ebastina y metabolitos es una modificación de la técnica de Matsuda y cols (2001). Las modificaciones consistieron en:

1. Anteriormente, se había utilizado una técnica de HPLC, y lo que hicimos fue acoplar la técnica de espectrometría de masas, para obtener una mayor sensibilidad y precisión en la detección de los compuestos.
2. Matsuda y cols. determinaron ebastina y metabolitos en muestras de plasma humano, nosotros hicimos la determinación en muestras de orina.
3. Se añadió menos cantidad de estándar interno (IS) a la muestra, suficiente para la cuantificación metabólica.
4. Se añadía IS al eluato final previo a la evaporación, y nosotros lo incorporamos junto a la muestra inicial de orina.
5. Se partía de 1 ml de plasma, nosotros partimos de 2 ml de orina.
6. La centrifugación era de 10 minutos y nosotros aplicamos 12 minutos.
7. Una vez que la muestra acondicionada se pasaba por los cartuchos sep-pak, Matsuda y cols. lavaban el cartucho 2 veces con 3 ml de agua mili-Q seguidos de 2 veces con 2ml de metanol, dicho lavado se suprimió en nuestra técnica para garantizar así la recuperación de la muestra.
8. El eluyente que se hizo pasar por los cartuchos para recuperar la muestra consistió en una solución de 2 ml de metanol-tampón fosfato 50 mM (pH= 2,5) (9:1, v/v), que pasaron a un volumen total de 4 ml formados por 2 ml de metanol, seguidos de 2 ml de una solución de metanol-tampón fosfato 50 mM (pH= 2,5) (9:1, v/v).
9. Se pasó a inyectar en el cromatógrafo un volumen de muestra de 30  $\mu$ l.

10. Se usó una columna cromatográfica diferente, de 7,5 cm de longitud, que permitió una perfecta separación de todos los picos.

11. Se pasó de utilizar una fase móvil compuesta por la mezcla acetonitrilo-metanol-tampón acetato amónico 0,012M (20:30:48, v/v/v), a emplear acetonitrilo-tampón acetato amónico 0,012M (52:48, v/v).

12. Una última modificación, que surgió en el transcurso de este estudio, fue el tener que preparar, para realizar las curvas de calibración, soluciones distintas de los diversos compuestos, que incluían concentraciones pequeñas y adecuadas a las concentraciones reales de cada sustancia detectada en humanos. Aparte de esto, algunos compuestos se deterioran con el tiempo y las condiciones ambientales, por lo que hay que preparar las soluciones con cierta regularidad y conservar en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

De la técnica original se incluyó la detección de desbutirofenona (des-alquilebastina). Se pasó pues a identificar los siguientes compuestos: **hidroxi-ebastina**, **carebastina**, **desbutirofenona** y **ebastina**.

### 1.3- Ratios urinarios de ebastina

Ebastina es un antihistamínico de segunda generación en cuya biotransformación están implicadas varias enzimas CYP. Ebastina sufre un elevado metabolismo de primer paso que parece ser crucial, se da el caso en algunos sujetos con disfunción hepática que no presentan diferencias metabólicas aparentes (Lasseter y cols., 2004). Por tanto, pequeños cambios sobre el efecto primer paso pueden causar grandes cambios en los niveles plasmáticos y en la farmacocinética del fármaco (Rohatagi y cols., 2001). Las enzimas responsables del metabolismo de ebastina, son principalmente CYP3A y CYP2J2, presentes en el intestino

(Guengerich, 1999, Hashizume y cols., 2002, Hashizume y cols., 2001), cuya actividad puede contribuir al mencionado efecto de primer paso y a la gran variabilidad interindividual observada. Dicha variabilidad se confirmó a través de eliminación del fármaco, resultando los niveles del compuesto generado por CYP3A, desbutirofenona, valores 3 veces más variables que los de carebastina (generado por CYP2J2), lo cual respalda otros estudios realizados con sustratos metabolizados por CYP3A (Inagaki y cols., 2002, McCune y cols., 2001).

Nosotros hemos evaluado los ratios metabólicos de ebastina (Ratio 1 y Ratio 2), en los distintos períodos metabólicos, basándonos en los ratios obtenidos en la literatura con respecto a otros fármacos como es el caso de la obtención de los ratios de midazolam (Shinderman y cols., 2003), para la determinación de la actividad metabólica CYP3A4.

Nuestro objetivo fue determinar la actividad CYP3A y CYP2J2, a través de los ratios metabólicos de ebastina, administrando por vía oral una única dosis de 20 mg.

Hasta ahora, en la literatura no se ha recogido el estudio de los ratios de ebastina, puesto que varios autores (Matsuda y cols., 1994, Yamaguchi y cols., 1994), informan de la ausencia del fármaco parental en plasma. Ello es debido a que ebastina, una vez administrada de forma oral, sufre un elevado efecto primer paso para dar lugar de forma mayoritaria a su metabolito activo carebastina, ello significa que ebastina es metabolizada de forma rápida y casi por completo con la consiguiente dificultad en su determinación en los distintos fluidos biológicos.

Nuestra técnica analítica, nos permitió la determinación de ebastina como tal, en orina, así como el metabolito intermedio hidroxilado (hidroxi-ebastina), siendo el límite más bajo de detección para ebastina y metabolitos de 0,3 ng/ml.

Gracias a la sensibilidad y precisión de nuestra técnica se pudieron determinar las cantidades del fármaco parental.

La magnitud de dichas mediciones era del orden de  $10^{-3}$ , por tanto, el cociente metabólico era muy elevado y nos movíamos con unos valores extremadamente pequeños, de tal modo que decidimos establecer el comportamiento de las enzimas a través de cantidades urinarias excretadas de fármaco y metabolitos, evitando así, posibles errores debidos al orden de magnitud.

Decidimos establecer el criterio anterior para evitar que cambios importantes en la actividad CYP3A o CYP2J2 pudieran no reflejarse en estos ratios de dicha magnitud.

Este ratio refleja también una correlación entre las dos rutas metabólicas conocidas de ebastina. Dichas rutas, han sido previamente correlacionadas por autores tales como Hashizume y cols. (Hashizume y cols., 1998), quienes caracterizaron las isoformas CYP responsables del metabolismo de ebastina (N-desalquilación e hidroxilación), mediante microsomas humanos hepáticos y estudios de inhibición.

Con respecto al ratio, el numerador contiene el metabolito producido por CYP3A y CYP2J2 respectivamente, y el denominador se refiere al fármaco parental. El tiempo de recogida de la muestra de 0-4 y de 4-24 horas, surgió para poder determinar metabolitos más polares que antes pudieran desaparecer en orina, por ello el primer período; pero como resultado obtuvimos una mayor eliminación en el segundo, para todos los metabolitos.

Los coeficientes de correlación entre la des-alquilación e hidroxilación de ebastina no fueron estadísticamente significativos. Se aplicó el test de Spearman ( $r=0,08$ ,  $p < 0,33$ ). Se vieron correlaciones referentes a cantidades urinarias.

#### **1.4- Efectos del sexo y el tabaco sobre la actividad del CYP3A y CYP2J2**

En la introducción se comentó la existencia de diferencias sexuales en el metabolismo de algunos fármacos. También se ha citado en numerosas ocasiones, que citocromos tales como el CYP1A2 son inducibles por hidrocarburos aromáticos policíclicos, como los contenidos en el humo del tabaco (Carrillo y cols., 2003) .

Las diferencias farmacocinéticas relacionadas con el sexo, han sido ampliamente revisadas por autores tales como Harris y cols. (Harris y cols., 1995), posteriormente por Beierle y cols., (Beierle y cols., 1999). La observación de que el aclaramiento de los fármacos metabolizados por CYP3A4 son frecuentemente más altos en mujeres que en hombres es un clásico ejemplo de diferencias metabólicas relacionadas con el sexo (Harris y cols., 1995). Esta diferencia fue inicialmente asumida como resultado de una mayor expresión de la proteína CYP3A4 en mujeres comparada con los hombres, pero faltan evidencias que soporten esta hipótesis.

En estudios recientes, se refleja una actividad CYP3A más elevada en mujeres que en hombres (Harris y cols., 1995). De manera similar, un estudio realizado con el agente nifedipino, relacionó la influencia de la raza y del género con la eliminación de dicho fármaco, encontrando datos de aclaramiento del fármaco significativamente más bajos en los individuos de raza negra que en los de raza blanca, así como de igual modo ocurre entre hombres y mujeres, presentando los hombres un aclaramiento menor del fármaco y no encontrando diferencias significativas con respecto a la edad (Krecic-Shepard y cols., 2000).

De igual modo, obtienen Dally y cols. las mismas conclusiones, cuando realizan un estudio sobre la influencia del género y el tabaco en el riesgo de cáncer de pulmón en aquellas personas que presentan el alelo CYP3A4\*1B, encontrando un riesgo más elevado en mujeres



portadoras del alelo CYP3A4\*1B siendo fumadoras, en comparación con los hombres portadores de dicho alelo, también fumadores, debido a una mayor actividad metabólica, ya que el CYP3A está implicado en el metabolismo de muchos carcinógenos (Dally y cols., 2003). Krecic-Shepard y cols. también aportaron diferencias relativas al tabaco (menor aclaramiento de nifedipino en fumadores que en no fumadores) (Krecic-Shepard y cols., 2000).

Por el contrario, hay otras teorías que no respaldan el hecho de que las mujeres presenten una mayor expresión de la proteína CYP3A4, así pues, Hunt y cols. (Hunt y cols., 1992), encontraron un 24% de actividad CYP3A más alto en hombres que en mujeres a través de estudios comparativos en microsomas hepáticos de mujeres y hombres, al igual que varios autores, (George y cols., 1995, Schmucker y cols., 1990, Shimada y cols., 1994), que habían examinado el contenido proteico y la función hepática y no pudieron demostrar diferencias significativas respecto al sexo.

Una de las teorías propuestas es la influencia de las hormonas femeninas (sustratos conocidos de CYP3A), las cuales pueden jugar un papel importante en la modulación de la respuesta referente al género (Harris y cols., 1995).

Otro posible mecanismo presentado por Cummins y cols. (Cummins y cols., 2002), es atribuir las diferencias a la interacción de los fármacos con un transportador de membrana, la glicoproteína P (P-gp), la cual puede tener un papel importante en la interacción del enzima con el fármaco y que no se refleja en los experimentos in vitro con microsomas hepáticos.

Un estudio de la expresión de P-gp, realizado con biopsias hepáticas de hígados normales, encontró variaciones de hasta 55 veces en la población (Schuetz y cols., 1995), siendo el nivel de expresión de P-gp, 2,4 veces más alto en hombres que en mujeres, ello podría explicar un incremento de la disponibilidad de sustrato en el hepatocito debido a una

menor actividad de P-gp hepática en mujeres con el resultante aumento del metabolismo y aclaramiento, aunque el nivel de proteína CYP3A fuera el mismo tanto en hombres como en mujeres (Meibohm y cols., 2002).

En cuanto a los valores obtenidos en nuestro estudio, existe una tendencia clara que muestra niveles de metabolitos (desbutirofenona y carebastina), más elevados en mujeres, en todos los períodos estudiados. De hecho, las mujeres mostraron niveles estadísticamente significativos más altos de desbutirofenona (85% más altos ) que los hombres para 4-24h ( $p < 0,01$ ) y de 0-24h ( $p < 0,005$ ). La misma tendencia se apreció en el metabolismo de carebastina, no siendo las variaciones estadísticamente significativas. Los niveles correspondientes a 0-4h no alcanzaron la significación, debido a la extrema variabilidad en los volúmenes de orina excretados durante este intervalo, siendo muchos de ellos cero (tabla XX). No encontramos en nuestro estudio variaciones metabólicas significativas al comparar sujetos fumadores con no fumadores (tabla XX).

Estudios previos, han mostrado que la actividad CYP3A de las mujeres sobre numerosos sustratos es más alta que la de los hombres (Krecic-Shepard y cols., 2000, Schwartz, 2003, Zhu y cols., 2003).

Es más, el género se ha asociado a la magnitud de reacciones adversas en la capacidad de conducir, tras el consumo de antihistamínicos de segunda generación (Verster y Volkerts, 2004).

Sin embargo, un estudio de los efectos del género sobre el metabolismo de ebastina (Rohatagi y cols., 2001), no pudo encontrar diferencias farmacocinéticas entre hombres y mujeres, aunque tan solo se midieron el compuesto parental y el metabolito carebastina, no mediado por la actividad CYP3A. Dicho estudio confirma también la ausencia de diferencias relevantes existentes en sujetos de distinta edad (el estudio se realizó con personas de grupos

de edad muy diferentes) referentes al metabolismo de ebastina/carebastina, hecho que también se confirma en nuestro estudio.

Los datos referentes al tabaco, no establecen diferencias respecto al hábito tabáquico, excepto en el grupo de las mujeres, presentando un metabolismo más elevado para desbutirofenona (compuesto generado por CYP3A), aquellas mujeres no fumadoras. Dichos datos fueron estadísticamente significativos Sin embargo, los datos recogidos hasta ahora en la bibliografía, hacen referencia a la ausencia de efecto del tabaco sobre la actividad CYP3A (Guengerich y cols., 1994, Villard y cols., 1998), con lo cual, no podemos asegurar la influencia (inducción) del tabaco sobre el metabolismo CYP3A, pero tampoco debemos descartarla ante los datos obtenidos.

Por otro lado, debido al pequeño tamaño de la muestra compuesta por hombres fumadores (n=4), no podemos concretar en lo referente al tabaquismo, sería necesario contar con una población mayor de hombres fumadores.

## **2.- ESTUDIO DE GENOTIPACIÓN DE LOS CITOCROMOS P450 3A (CYP3A) Y 2J2 (CYP2J2)**

---

### **2.1.- Frecuencias alélicas del CYP3A4 y CYP3A5 en la población española**

El hallazgo de los polimorfismos de un solo nucleótido en los genes CYP3A4 y CYP3A5 durante los pasados años, ha conducido a un incremento del número de investigaciones tratando de establecer el significado funcional de estas mutaciones. Hasta la fecha, la gran mayoría de dichas investigaciones realizadas en poblaciones caucásicas, se han centrado en las variantes más comunes, CYP3A5\*3 o CYP3A4\*1B. Sin embargo, estudios de genotipación simultáneos de ambos alelos, son todavía escasos o inexistentes en poblaciones tales como la española.

Nuestro análisis genotípico tuvo como resultado, una frecuencia alélica CYP3A4\*1B (3,4%) similar a la de otras poblaciones cercanas tales como la portuguesa u otras poblaciones españolas (tabla XVI).

Sin embargo, los datos procedentes de nuestro estudio, revelan algunas peculiaridades de nuestra población. En primer lugar, a pesar de que las frecuencias alélicas CYP3A5 fueron muy similar entre españoles y otros caucásicos europeos (Xie y cols., 2004), sus frecuencias genotípicas fueron significativamente diferentes a las nuestras ( $\chi^2 = 11,65$ ,  $p=0,0030$ ). La diferencia entre españoles y otros europeos consiste en la presencia de menor número de individuos portadores de la combinación alélica CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1 en nuestra población (71,4%) comparado con otros europeos (87,5%) (Dally y cols., 2004).

El genotipo homocigoto wild type CYP3A5\*1/\*1 estuvo presente en un 2% de los individuos estudiados (tabla XVI), mientras que tal genotipo se encuentra presente en menos

de un 1% en caucásicos americanos y justo en un 0,4% en caucásicos europeos (Xie y cols., 2004).

De hecho, 6 estudios realizados en caucásicos europeos con un total de 631 sujetos no halló ni un solo portador homocigoto CYP3A5\*1 (Hesselink y cols., 2003, Hustert y cols., 2001, King y cols., 2003, Koch y cols., 2002, Westlind-Johnsson y cols., 2003).

Un estudio realizado con 27 individuos de raza hispánica, presentó un 3,7% de portadores CYP3A5\*1/\*1 (Blanco y cols., 2002). Cabe destacar, que los españoles, han mostrado previamente diferentes frecuencias de SNPs en los genes CYP con respecto a otras poblaciones caucásicas (Agundez y cols., 1995, Agundez y cols., 1994, Bernal y cols., 1999). Es más, se ha mostrado un aumento en la frecuencia de individuos homocigotos para el alelo wild type CYP2D6 entre metabolizadores rápidos en españoles comparados con otras poblaciones de raza blanca (Agundez y cols., 1994).

Como consecuencia del elevado número de portadores homocigotos CYP3A5\*1 presentes en nuestra población, un porcentaje relativamente alto (1,9%) de individuos resultó ser wild type para ambos genes CYP3A4 y CYP3A5. En comparación, un estudio de 428 voluntarios sanos alemanes no encontró ni un solo individuo con tal combinación genotípica (Dally y cols., 2004). Estos individuos deberían presentar un mayor metabolismo para sustratos de la isoforma CYP3A que el resto de los caucásicos. Sin embargo, ha de ser elucidado si los individuos con un único alelo wild type (heterocigotos), quienes son capaces de expresar la proteína funcional (Hustert y cols., 2001, King y cols., 2003, Kuehl y cols., 2001), lo hacen en cantidades equivalentes a aquellos sujetos homocigotos wild type. Con respecto a esto, Dally y cols (Dally y cols., 2003) sugirieron que el CYP3A5\*1, el cual está implicado en la activación de procarcinógenos (Piipari y cols., 2000), puede ser un factor de riesgo en cancer de pulmón solo en el caso de portadores del alelo 1 homocigotos pero no

para heterocigotos. Un reciente estudio, informó del importante descenso de los niveles en sangre de tacrolimo de acuerdo con el genotipo siguiente ( $*3/*3 > *1/*3 > *1/*1$ ) (Haufrond y cols., 2004).

Estudios realizados en poblaciones caucásico americanas y norte europeas en pacientes transplantados, han revelado que los portadores de CYP3A5\*1 tratados con inmunosupresores como el tacrólimo (Haufrond y cols., 2004, Hesselink y cols., 2003, Thervet y cols., 2003) y en menor medida con ciclosporina (Haufrond y cols., 2004), parecen necesitar dosis mayores que los portadores del CYP3A5\*3. La presencia inusual de un alto número de portadores wild type CYP3A5\*1 en españoles haría que los requerimientos de dosis superiores en la población fueran más frecuentes. Es más, puede que el CYP3A4 también esté implicado en el metabolismo de tacrolimo (Hesselink y cols., 2003), la existencia del 1,9% de individuos homocigotos wild type para CYP3A4 y CYP3A5 podría incrementar el riesgo de inmunosupresión y rechazo agudo en estos sujetos.

Por otro lado, el 1,9% de los individuos de nuestro estudio, resultaron ser heterocigotos para CYP3A4\*1B y mutantes homocigotos para CYP3A5\*3. Tal combinación genotípica, es 3 veces menor entre caucásicos europeos (Dally y cols., 2004). En caucásico-americanos, un estudio demostró que el haplotipo \*1B/\*3 estuvo presente en tan solo el 0,6% de los sujetos, siendo aún menor el número de individuos portadores de la combinación genotípica (Plummer y cols., 2003).

El inesperado número de individuos portadores de la asociación \*1A/\*1B -\*3/\*3, nos lleva a reevaluar algunos de los hallazgos recientes, considerando solo uno de los alelos. De especial interés sería re-interpretar, estudios de asociación de un solo alelo con ciertas enfermedades. De hecho, existe la relación bien sea de forma directa o indirecta, de CYP3A4\*1B con un mayor grado de cancer de próstata (Paris y cols., 1999, Rebbeck y cols.,

1998) y leucemia mieloide aguda secundaria al tratamiento con epipodofilotoxina (Felix y cols., 1998), aún no clarificada del todo, pero ya se ha sugerido la posible contribución del polimorfismo CYP3A5 (Lamba y cols., 2002, Xie y cols., 2004), en dicho proceso.

Los estudios preliminares sobre la asociación genotípica CYP3A4\*1B / CYP3A5\*3 y el riesgo de enfermedad, han relacionado la combinación de dicho haplotipo con cancer de próstata (Plummer y cols., 2003) y la toxicidad tras la terapia con agentes quimioterápicos (Aplenc y cols., 2003).

Nuevos estudios de dicha combinación, poco frecuentes en caucásicos, pero más frecuentes en nuestra población, podrían ayudar a clarificar estas asociaciones genotípicas.

En resumen, la existencia de combinaciones genotípicas individuales tanto de los dos genotipos activos o inactivos CYP3A4 / CYP3A5, es poco frecuente en caucásicos, tanto europeos como americanos, mientras que en españoles aparecen en un 3,6% de la población. Pensamos por tanto, que este porcentaje podría justificar la genotipación simultánea de las variantes CYP3A4 y CYP3A5 para dicha población en ciertas circunstancias, por ejemplo en la prescripción de pautas de dosificación para fármacos que se metabolizan mediante CYP3A y que posean un estrecho margen terapéutico. Lo que es más, en la base de estos hallazgos, la genotipación simultánea de CYP3A4 y CYP3A5 parece ser necesaria para determinar asociaciones fenotípicas, incluyendo el riesgo a posibles enfermedades, al menos en los españoles y otras posibles poblaciones.

## **2.2.- Frecuencias alélicas del CYP2J2 en la población española**

Los polimorfismos genéticos, son claramente la mayor causa de variación interindividual de la expresión y funcionalidad de un número importante de enzimas P450

(Cascorbi, 2003, Desta y cols., 2002, Huang y cols., 2003, Schwarz, 2003, Thervet y cols., 2003).

Experimentos *in vitro* del CYP2J2, han demostrado que la variante CYP2J2\*7 conduce a una reducción del nivel de transcripción dando lugar a una pérdida del sitio de unión, mientras que las demás variantes, a excepción de CYP2J2\*5, proporcionan un descenso de hasta el 90% en la capacidad metabolizadora de los ácidos araquidónico y linoleico (King y cols., 2002).

En nuestro estudio, tuvimos como objetivo en primer lugar, determinar la frecuencias de las variantes alélicas CYP2J2 *in vitro* en la población española de voluntarios sanos mediante las técnicas descritas en el apartado de Material y Método.

La presencia de polimorfismos en el gen CYP2J2, es un hallazgo bastante reciente, y a pesar del hecho de que las consecuencias funcionales *in vivo* no han sido aún determinadas, parece probable (teniendo en cuenta los datos de estudios preliminares *in vitro*), de que importantes procesos biológicos tales como la producción de ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) a partir del ácido araquidónico, podría verse afectada y, como consecuencia, importantes funciones biológicas, en las cuales estos EETs están localmente involucrados, por ejemplo procesos de inflamación, hemostasis o el tono vascular de la musculatura lisa, pudieran verse comprometidos.

Con respecto a lo anterior, la única posibilidad de reflejar *in vivo* el efecto del genotipo CYP2J2, falló al encontrar una asociación entre la variante CYP2J2\*6 y complicaciones vasculares en pacientes caucásicos con diabetes mellitus (Pucci y cols., 2003).

Sin embargo, la frecuencia de esta variante alélica se encontró extremadamente baja en nuestro estudio, no encontramos ningún mutante homocigoto presente en nuestra población,



por lo que la comparación de portadores CYP2J2\*6 con el genotipo wild-type entre individuos necesita una investigación más exhaustiva.

Estudios previos, han sugerido que los españoles pueden presentar una mutación diferente al resto de las poblaciones caucásicas referentes al polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) presente en los genes CYP (Agundez y cols., 1994, Bernal y cols., 1999). Al igual ocurre con el caso del polimorfismo CYP2J2\*6, ausente en la población española y muy poco común entre los italianos (Pucci y cols., 2003), una población relativamente cercana, mientras que dicho polimorfismo mostró una frecuencia del 2% en población caucásica norte americana (King y cols., 2002).

Los resultados que hemos obtenido, en conjunto, revelan que el estudio de los diferentes alelos CYP2J2, no parece ser relevante en caucásicos con la excepción de la mutación CYP2J2\*7. Sin embargo, podría ser importante en otras poblaciones como las asiáticas o de raza negra, las cuales presentan frecuencias más altas para casi todas las variantes alélicas identificadas para CYP2J2.

Actualmente, existen numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), presentes en otros genes CYP que pueden ser identificados directamente por genotipación, empleando endonucleasas de restricción (Adithan y cols., 2003a, Adithan y cols., 2003b, Cavalli y cols., 2001, Topic y cols., 2004, van Schaik y cols., 2002). Del mismo modo, nuestro estudio, proporciona una herramienta rápida y efectiva para la detección de todas las variantes alélicas funcionales de CYP2J2, siendo adecuado para estudios de prevalencia de polimorfismo en una población. Es más, este método es más fácil y menos caro que la secuenciación de DNA y por lo tanto, puede ayudar al desarrollo de estudios posteriores sobre los efectos in vivo de los polimorfismos CYP2J2.

### **3.- ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL METABOLISMO DE EBASTINA: EBASTINA Y ZUMO DE POMELO**

---

El zumo de pomelo es una bebida consumida en grandes cantidades por la población en general, es un inhibidor del sistema citocromo P450 3A4 intestinal, el cual es responsable del efecto de primer paso de muchas medicaciones, como ya se comentó en la introducción en el apartado del efecto de la dieta sobre el metabolismo de fármacos.

Lo más notable a destacar con respecto al zumo de pomelo son las interacciones encontradas y sus efectos sobre las ciclosporinas, antagonistas de calcio, y algunos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. En algunos casos, el incremento de las concentraciones se ha relacionado con el incremento en la frecuencia de aparición de reacciones adversas dosis-dependientes (Kane y Lipsky, 2000).

Medicamentos tales como itraconazol, ketoconazol, ciclosporina, diltiazem y eritromicina inhiben tanto al CYP3A4 intestinal como hepático. Así, la reducción del metabolismo presistémico de un fármaco, incrementa la cantidad de fármaco absorbido (biodisponibilidad oral).

Parece ser que el zumo de pomelo provoca una inhibición a nivel intestinal y no a nivel hepático debido a que a dosis normales, el zumo de pomelo no tiene efectos sobre la farmacocinética de estos fármacos cuando se administran por vía intravenosa y que los fármacos que interaccionan con zumo de pomelo, son metabolizados por el sistema enzimático CYP3A4 en intestino delgado.

Se piensa que el mecanismo de esta interacción está basado tanto en una inhibición como en la inactivación del enzima, producida por dihidrobergamota y otras cumarinas derivadas encontradas en el zumo de pomelo, aunque también parecen estar implicados

bioflavonoides tales como naringina, naringenina, quercetina y kaenferol (Harris y cols., 2003). Esto explicaría la rápida inhibición producida por el zumo de pomelo. Se produce una reducción del 47% en la concentración intestinal de CYP3A4 a las 4 horas tras la ingestión de zumo de pomelo, manteniéndose dicho efecto durante 24 horas (Lundahl y cols., 1995).

En general, parece que la interacción es más prevalente en aquellos fármacos que presentan un significativo metabolismo intestinal (Feldman, 1997, Kane y Lipsky, 2000, Lown y cols., 1997).

En nuestro estudio, hemos podido comprobar la inhibición producida por el zumo de pomelo sobre la actividad CYP3A, encontrando diferencias estadísticamente significativas al comparar niveles basales de desbutirofenona con niveles tras la administración del zumo de pomelo.

Se procedió de igual modo a comparar el grupo de hombres y mujeres, para ver si la inhibición podría influir de algún modo en el género, encontrando diferencias significativas, en el grupo de las mujeres con respecto a los hombres.

Respecto al sexo, tal y como se ha mencionado anteriormente, algunos autores tales como Harris y cols., afirman que la actividad CYP3A es más elevada en mujeres que en hombres, de tal modo que cabría esperar también una mayor inhibición en nuestros resultados en mujeres, según los datos que aporta Maskalyk (Maskalyk, 2002), el cual establece que aquellos individuos con concentraciones intestinales de CYP3A más elevadas, son más susceptibles a la interacción con zumo de pomelo.

Aún no se ha identificado el componente preciso del zumo de pomelo, responsable de la interacción. Diversos autores, han aislado los distintos componentes con el fin de determinar cuál es el responsable directo de la actividad, pero esta cuestión sigue sin ser

clarificada en la actualidad debido a la gran diversidad de resultados obtenidos (Zhou y cols., 2004).

Por otro lado, el zumo de pomelo también es un potente inhibidor de la glicoproteína P (Pg-P). Se trata de una proteína transportadora localizada en las paredes intestinales encargada de transportar numerosos sustratos del citocromo P450 3A4 (Takanaga y cols., 1998).

Los datos obtenidos de ebastina pueden reflejar la inhibición de la proteína transportadora, cosa que es poco probable debido al importante proceso de difusión pasiva que sufre el antihistamínico, dada su alta lipofilidad, además, la afinidad del fármaco por el transportador es muy escasa (Imamura y cols., 2001).

#### 4.- INFLUENCIA DEL GENOTIPO EN EL METABOLISMO DE EBASTINA

---

En el metabolismo de ebastina, a través de diferentes estudios, mencionados en el apartado Introducción, y el último de ellos realizado con microsomas hepáticos, han identificado la presencia de diferentes enzimas en su metabolismo, tales como CYP3A4 responsable de la desalkilación, CYP2J2 y en menor medida CYP4F12, como enzimas responsables de la oxidación (Fig. 5).

Debido a la gran variabilidad metabólica presentada por muchos fármacos, y en nuestro caso por ebastina, muchos estudios requieren de análisis complementarios además de la consideración de factores ambientales tales como la dieta, el tabaco, alcohol, café etc...

En nuestro estudio, hemos encontrado una extensa variabilidad interindividual la cual depende casi exclusivamente de factores genéticos, por lo tanto, decidimos respaldar la información metabólica con el correspondiente estudio genotípico, de este modo se pueden explicar la respuesta a ciertos fármacos, y constatar discrepancias clínicas aparentes.

Nuestro estudio por tanto, se basó en determinar los efectos de los polimorfismos CYP3A4, CYP3A5 y CYP2J2 in vivo, mediante los niveles urinarios de ebastina.

Aparte, nosotros decidimos analizar otros factores tales como el sexo y el tabaco que pudieran afectar la eliminación del fármaco.

En segundo lugar, en nuestro trabajo, establecimos un segundo test preliminar con el fin de comprobar si los niveles urinarios de desbutirofenona se correlacionaban con la actividad CYP3A in vivo.

Al estudiar los niveles en orina de desbutirofenona y carebastina, no encontramos asociaciones evidentes de dichos niveles con las variantes alélicas CYP3A4\*1B o CYP2J2\*7 en ninguno de los períodos estudiados (tabla XXV, Fig. 19).

Hubo tan solo 5 sujetos que fueran homocigotos para CYP3A4\*1B, con lo cual, se necesitarían estudios con mayor muestra de población y de diferentes poblaciones con frecuencias más altas de CYP3A4\*1B para establecer tal asociación.

De la misma manera, estudios de poblaciones de raza negra, con una presencia más alta de mutaciones CYP2J2, las cuales producen un descenso en la capacidad metabólica del enzima (King y cols., 2002), podrían ayudar a clarificar los efectos de los polimorfismos CYP2J2 in vivo. El resto de las mutaciones CYP2J2 presentes en individuos de raza blanca (CYP2J2\*6) muestran una frecuencia extremadamente baja y falta de efectos in vivo (Pucci y cols., 2003).

La inesperada presencia de portadores homocigotos (wild type) CYP3A5\*1 en una población caucásica (2 sujetos hallados en nuestro estudio), excluyó la realización de una comparación estadística, metabólicamente formal con los individuos portadores de CYP3A5\*3/\*3. Los portadores CYP3A5\*1/\*3 presentaron un 35% más altos los niveles de desbutirofenona que los individuos CYP3A5\*3/\*3 [0-24 horas: Media (DS), 26,1 (25,1) frente a 19,1 (16,5)] (tabla XXV, Fig. 19), esta tendencia no estuvo bajo la significancia estadística debido a la variabilidad en los datos. Estudios anteriores han demostrado que los individuos homocigotos para el alelo \*3, el cual no expresa la proteína funcional, muestran un metabolismo defectuoso y menor requerimiento de dosis que los sujetos heterocigotos para otros sustratos de CYP3A (Haufroid y cols., 2004, Thervet y cols., 2003). Sin embargo, la importancia clínica de estos hallazgos es limitada, debido al equilibrio existente entre los alelos CYP3A5\*3 y CYP3A4\*1A (Kuehl y cols., 2001), los individuos portadores del genotipo \*3/\*3 lo más probable es que sean wild type para CYP3A4 y así, ebastina podría metabolizarse a desbutirofenona, al menos en alguna medida. En cualquier caso, la reducción

en la actividad de CYP3A debe tenerse en cuenta cuando se administre ebastina debido a su posible toxicidad (Moss y Morganroth, 1999).

Finalmente, los polimorfismos CYP3A4 y CYP2J2 no afectaron a la eliminación de ebastina, sin embargo, el alelo CYP3A5\*3 puede que esté asociado con una eliminación alterada del fármaco, indicando por primera vez, que ambos genotipos, CYP3A4 y CYP3A5 puede que intervengan en el metabolismo de ebastina. La clarificación de la contribución individual de cada enzima podría garantizar futuros análisis. Aquí radica la importancia del estudio conjunto de ambas enzimas que describen un comportamiento estrechamente ligado.

Esta inicial asociación encontrada con respecto al polimorfismo CYP3A5\*3 y la eliminación de ebastina, nos condujo a llevar a cabo otros experimentos con el fin de determinar si de alguna manera, las medidas de desbutirofenona pueden reflejar la actividad CYP3A.

#### **4.1.- Influencia del genotipo en el metabolismo de ebastina y zumo de pomelo**

La administración de zumo de pomelo, un conocido inhibidor intestinal CYP3A4 (Guengerich y Kim, 1990), ha producido en nuestro estudio un modesto pero estadísticamente significativo descenso en la medida de las cantidades de desbutirofenona tal y como cabría esperar, por la inhibición del enzima CYP3A. La administración del zumo de pomelo, al subgrupo de población de 62 individuos resultó dar lugar a un descenso del 25% de los niveles de desbutirofenona en orina, el metabolito que precisamene es producido por CYP3A (Hashizume y cols., 1998) (Fig. 5).

Los niveles de carebastina, el metabolito generado por el CYP2J2 (Hashizume y cols., 2002) (Fig. 5), no fueron alterados de forma sustancial en ningún caso por ninguna de las

variantes alélicas estudiadas tras la administración del zumo de pomelo (0-24 horas,  $p=0,7$ ) (tabla XXI).

La figura 20, muestra un mayor descenso de los niveles de desbutirofenona en los individuos heterocigotos CYP3A4\*1B, desafortunadamente, en nuestro estudio, encontramos muy pocos individuos portadores de dicho alelo y así pues, las estimaciones estadísticas adecuadas sobre el grado de inhibición ocurrida entre individuos heterocigotos e individuos homocigotos wild type no se ha podido llevar a cabo, se necesitarían estudios con mayor número de muestra.

El mayor grado de inhibición está altamente correlacionado con la expresión CYP3A5 (presencia del alelo CYP3A5\*1) (Fig. 20). Dicho estudio, refuerza de nuevo los hallazgos comentados en el apartado anterior, de tal modo que se refuerza el posible papel de CYP3A5 en el metabolismo de ebastina.

Cabe destacar, que las dos mujeres de los tres individuos que presentan un mayor grado de inhibición (figura 20) se quejaron, de sufrir una elevada sedación tras la administración concomitante de ebastina y zumo de pomelo, lo cual puede ser debido a un incremento del fármaco parental tras la inhibición de la ruta mediada por CYP3A, y/o al desplazamiento metabólico de la ruta que conduce al metabolito farmacológicamente activo, carebastina (figura 5).

Estos hallazgos coinciden con un estudio inicial que se llevó a cabo mediante inmunoensayo sobre las vellosidades intestinales dando lugar a un descenso del contenido proteico CYP3A5 tras la ingesta con zumo de pomelo (Lown y cols., 1997). Es necesario remarcar la consideración de que CYP3A5 contribuye con el metabolismo de ciertos sustratos de CYP3A que son inhibidos por el zumo de pomelo tales como el midazolam (Williams y cols., 2003), estradiol (Lee y cols., 2001) y ciclosporina (Haufröid y cols., 2004), entre otros.



Además, los niveles en sangre de tacrolimo, un fármaco cuya dosis requerida se ha demostrado que está asociado al genotipo CYP3A5 (Thervet y cols., 2003, Zheng y cols., 2004), se incrementan con la ingesta de zumo de pomelo (Egashira y cols., 2003). Es más, CYP3A5 se expresa polimórficamente en el intestino (Kuehl y cols., 2001), que es precisamente donde tiene lugar la inhibición. Por todo lo anterior, podemos confirmar la idea de la inhibición del zumo de pomelo sobre CYP3A4/5.

Por otro lado, el zumo de pomelo también inhibe al transportador de membrana glicoproteína P (Pg-p) (Takanaga y cols., 1998), hemos de considerar que nuestros datos también pudieran estar reflejando una modulación sobre el transporte de ebastina, sin embargo, como ya se adelantó anteriormente, parece poco probable debido al proceso de difusión pasiva del antihistamínico, por su alta lipofilidad, y baja afinidad por el transportador (Imamura y cols., 2001).

## **CONCLUSIONES**

1. La técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (LC/MS), que hemos aplicado en nuestro estudio, resulta ser sensible, reproducible y relativamente sencilla para la determinación de ebastina y sus metabolitos principales en orina.
2. Corroborando los datos obtenidos por otros autores, la mayoría de los sujetos presentaron un genotipo homocigoto wild-type para CYP3A4 (93%) y un genotipo homocigoto mutante para CYP3A5\*3 (84%), lo que se traduce en estos últimos en una carencia del enzima funcional.
3. Las frecuencias alélicas CYP2J2\*1 y CYP2J2\*7 fueron 93% y 7%, respectivamente, con una distribución similar entre hombres y mujeres.
4. El metabolito activo carebastina, ha sido el compuesto eliminado en mayor cantidad en la orina en la población estudiada, lo cual corrobora los datos obtenidos por otros autores.
5. La eliminación urinaria del metabolito desbutirofenona, cuya formación es mediada por CYP3A, es significativamente más alta en mujeres que en hombres.

6. La ingesta de zumo de pomelo como compuesto de la dieta, ejerció una inhibición significativa del metabolismo de ebastina (posiblemente a través de un efecto inhibitorio a nivel del CYP3A), manifestada por la detección de unos niveles urinarios más bajos de desbutirofenona en nuestra población.
7. Tras la administración de zumo de pomelo, varios individuos (13%), presentaron somnolencia moderada, siendo dicha variación significativa ( $p=0,0167$ ), con respecto al periodo basal sin zumo de pomelo.
8. El hábito tabáquico podría influir en la eliminación urinaria de ebastina y sus metabolitos, en concreto en el subgrupo de mujeres no fumadoras, las cuales presentan niveles más elevados de desbutirofenona en orina, siendo dicha eliminación estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ).
9. Los polimorfismos en los genes involucrados en el metabolismo de ebastina, no afectan a la eliminación del fármaco, con la excepción de CYP3A5\*3, el cual está asociado, al menos en nuestro estudio, con niveles **más bajos** de desbutirofenona en orina, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adithan C, Gerard N, Naveen AT, Koumaravelou K, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. Genotype and allele frequency of CYP2D6 in Tamilian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003a; **59**: 517-20.
- Adithan C, Gerard N, Vasu S, Rosemary J, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. Allele and genotype frequency of CYP2C19 in a Tamilian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003b; **56**: 331-3.
- Agundez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benitez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **57**: 265-9.
- Agundez JA, Martinez C, Ledesma MC, Ladona MG, Ladero JM, Benitez J. Genetic basis for differences in debrisoquin polymorphism between a Spanish and other white populations. *Clin Pharmacol Ther* 1994; **55**: 412-7.
- Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1588-90.
- Ando Y, Tateishi T, Sekido Y, Yamamoto T, Satoh T, Hasegawa Y, Kobayashi S, Katsumata Y, Shimokata K, Saito H. Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1587-90.
- Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 2409-14.
- Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10388-95.
- Aplenc R, Glatfelter W, Han P, Rappaport E, La M, Cnaan A, Blackwood MA, Lange B, Rebbeck T. CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **122**: 240-4.
- Baba S MS, Sakakura Y. Clinical trial of LAS-90 on perennial allergic rhinitis: a double blind study in comparison with ketotifen fumarate. *Rinsho Iyaku* 1994; **10**: 1143-1162.
- Bailey D, Muñoz C, Arnold JMO, Strong HA, Spence JD. Grapefruit juice and naringin interaction with nitrendipine. *Clin. Pharmacol. Ther* 1992; **51**: 156.
- Bailey DG, Arnold JM, Bend JR, Tran LT, Spence JD. Grapefruit juice-felodipine interaction: reproducibility and characterization with the extended release drug formulation. *Br J Clin Pharmacol* 1995; **40**: 135-40.
- Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD. Grapefruit juice--felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther* 1993a; **53**: 637-42.
- Bailey DG, Arnold JM, Strong HA, Munoz C, Spence JD. Effect of grapefruit juice and naringin on nisoldipine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1993b; **54**: 589-94.

- Bailey DG, Bend JR, Arnold JM, Tran LT, Spence JD. Erythromycin-felodipine interaction: magnitude, mechanism, and comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **60**: 25-33.
- Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD, Arnold JM. Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin Invest Med* 1989; **12**: 357-62.
- Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JM. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* 1991; **337**: 268-9.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 288-94.
- Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999; **37**: 529-47.
- Benton RE, Honig PK, Zamani K, Cantilena LR, Woosley RL. Grapefruit juice alters terfenadine pharmacokinetics, resulting in prolongation of repolarization on the electrocardiogram. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **59**: 383-8.
- Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 657-60.
- Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, Bash RO, Behm FG, Camitta BM, Pui CH, Raimondi SC, Relling MV. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 605-11.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; **234**: 177-86.
- Brosen K. Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 1A2. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29 Suppl 1**: 20-5.
- Caccia S, Garattini S. Formation of active metabolites of psychotropic drugs. An updated review of their significance. *Clin Pharmacokinet* 1990; **18**: 434-59.
- Cadioux RJ. Drug interactions in the elderly. How multiple drug use increases risk exponentially. *Postgrad Med* 1989; **86**: 179-86.
- Carrillo JA, Herraiz AG, Ramos SI, Gervasini G, Vizcaino S, Benitez J. Role of the smoking-induced cytochrome P450 (CYP)1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 2003; **23**: 119-27.
- Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome p4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest* 2003; **33 Suppl 2**: 17-22.
- Cavaco I, Gil JP, Gil-Berglund E, Ribeiro V. CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 1345-50.
- Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem* 2001; **47**: 348-51.
- Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 1205-9.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 695-8.

- Cummins CL, Wu CY, Benet LZ. Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**: 474-89.
- Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**: 825-31.
- Dally H, Bartsch H, Jager B, Edler L, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Kayser K, Schulz V, Risch A. Genotype relationships in the CYP3A locus in Caucasians. *Cancer Lett* 2004; **207**: 95-9.
- Dally H, Edler L, Jager B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Schulz V, Kayser K, Bartsch H, Risch A. The CYP3A4\*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 607-18.
- de Molina M CL, Cano L. Efficacy and tolerability of ebastine at two dose levels in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Drug Invest* 1989; **1**: 40-46.
- Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**: 913-58.
- Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; **43**: 149-73.
- Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **57**: 485-91.
- Eap CB BT, Hustert E, Bleiber G, Golay KP, Aubert AC et al. Pharmacokinetics of midazolam in CYP3A4- and CYP3A5-genotyped subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2004.
- Edgar B, Bailey D, Bergstrand R, Johnsson G, Regardh CG. Acute effects of drinking grapefruit juice on the pharmacokinetics and dynamics of felodipine--and its potential clinical relevance. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; **42**: 313-7.
- Edwards DJ, Bellevue FH, 3rd, Woster PM. Identification of 6',7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice. *Drug Metab Dispos* 1996; **24**: 1287-90.
- Edwards DJ, Bernier SM. Naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice. *Life Sci* 1996; **59**: 1025-30.
- Egashira K, Fukuda E, Onga T, Yogi Y, Matsuya F, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y. Pomelo-induced increase in the blood level of tacrolimus in a renal transplant patient. *Transplantation* 2003; **75**: 1057.
- Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA, Khan KK, He YA, Halpert JR, Wojnowski L. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 447-58.
- Farin FM, Omiecinski CJ. Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J Toxicol Environ Health* 1993; **40**: 317-35.
- Feldman EB. How grapefruit juice potentiates drug bioavailability. *Nutr Rev* 1997; **55**: 398-400.
- Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 13176-81.



- First MR, Schroeder TJ, Michael A, Hariharan S, Weiskittel P, Alexander JW. Cyclosporine-ketoconazole interaction. Long-term follow-up and preliminary results of a randomized trial. *Transplantation* 1993; **55**: 1000-4.
- Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL, Jr., Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 595-606.
- Fuhr U, Klittich K, Staib AH. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *Br J Clin Pharmacol* 1993; **35**: 431-6.
- Fuhr U, Maier A, Keller A, Steinijans VW, Sauter R, Staib AH. Lacking effect of grapefruit juice on theophylline pharmacokinetics. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1995; **33**: 311-4.
- Fujii T, Matsumoto S, Amejima H, Hatoyama T, Nakao M, Kagemoto A, Tanaka K, Miyazaki H. Absorption, distribution, metabolism and excretion of [<sup>14</sup>C]ebastine after a single administration in rats. *Arzneimittelforschung* 1994; **44**: 527-38.
- Fujii T, Matsumoto S, Hatoyama T, Miyazaki H. Studies on the first-pass metabolism of ebastine in rats. *Arzneimittelforschung* 1997; **47**: 949-53.
- Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, Garcia-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, Agundez JA. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **71**: 196-204.
- Gehannol P B-OC, Zeisser P. A double-blind multicenter randomized study comparing once daily oral administration of ebastine 20 mg, ebastine 10 mg, and cetirizine 10 mg for the treatment of seasonal allergic rhinitis in adults.
- George J, Byth K, Farrell GC. Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver. *Biochem Pharmacol* 1995; **50**: 727-30.
- Gillen MS, Miller B, Chaikin P, Morganroth J. Effects of suprathreshold doses of ebastine and terfenadine on the QT interval. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **52**: 201-4.
- Goldberg MJ, Spector R, Chiang CK. Transport of diphenhydramine in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **240**: 717-22.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 1994; **26**: 165-83.
- Gonzalez FJ, Meyer UA. Molecular genetics of the debrisoquin-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1991; **50**: 233-8.
- Gonzalez FJ, Schmid BJ, Umeno M, McBride OW, Hardwick JP, Meyer UA, Gelboin HV, Idle JR. Human P450PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase. *DNA* 1988a; **7**: 79-86.
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988b; **331**: 442-6.
- Grogan WM, Phillips VM, Schuetz EG, Guzelian PS, Watlington CO. Corticosterone 6 beta-hydroxylase in A6 epithelia: a steroid-inducible cytochrome P-450. *Am J Physiol* 1990; **258**: C480-8.
- Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol* 1997; **43**: 7-35.
- Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**: 1-17.

- Guengerich FP, Kim DH. In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 2275-9.
- Guengerich FP, Shimada T, Yun CH, Yamazaki H, Raney KD, Thier R, Coles B, Harris TM. Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P4501A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes. *Environ Health Perspect* 1994; **102 Suppl 9**: 49-53.
- Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB, Hall SD. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 52-9.
- Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Saarikoski S, Vahakangas K, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Pasanen M. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate* 2001; **80**: 193-201.
- Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res* 2002; **500**: 103-10.
- Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* 1995; **50**: 222-39.
- Harris RZ, Jang GR, Tsunoda S. Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**: 1071-88.
- Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **300**: 298-304.
- Hashizume T, Mise M, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T, Imaoka S, Funae Y, Kamataki T, Miyazaki H. A novel cytochrome P450 enzyme responsible for the metabolism of ebastine in monkey small intestine. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 798-805.
- Hashizume T, Mise M, Terauchi Y, O L, Fujii T, Miyazaki H, Inaba T. N-Dealkylation and hydroxylation of ebastine by human liver cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 1998; **26**: 566-71.
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 147-54.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **74**: 245-54.
- Hollander AA, van Rooij J, Lentjes GW, Arbouw F, van Bree JB, Schoemaker RC, van Es LA, van der Woude FJ, Cohen AF. The effect of grapefruit juice on cyclosporine and prednisone metabolism in transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **57**: 318-24.
- Honig PK, Wortham DC, Lazarev A, Cantilena LR. Grapefruit juice alters the systemic bioavailability and cardiac repolarization of terfenadine in poor metabolizers of terfenadine. *J Clin Pharmacol* 1996; **36**: 345-51.
- Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, Huang JD. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 268-73.

- Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003; **37**: 924-30.
- Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 1996; **24**: 899-905.
- Huang Z, Guengerich FP, Kaminsky LS. 16Alpha-hydroxylation of estrone by human cytochrome P4503A4/5. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 867-72.
- Hukkinen SK, Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**: 127-31.
- Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 275-83.
- Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 773-9.
- Imamura Y, Shimizu K, Yamashita F, Yamaoka K, Takakura Y, Hashida M. Transport characteristics of ebastine and its metabolites across human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *Biol Pharm Bull* 2001; **24**: 930-4.
- Inagaki K, Inagaki M, Kataoka T, Sekido I, Gill MA, Nishida M. A wide interindividual variability of urinary 6beta-hydroxycortisol to free cortisol in 487 healthy Japanese subjects in near basal condition. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 722-7.
- Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001; **250**: 186-200.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 342-9.
- Janardan SK, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Watkins PB. Selective expression of CYP3A5 and not CYP3A4 in human blood. *Pharmacogenetics* 1996; **6**: 379-85.
- Jounaidi Y, Hyrailles V, Gervot L, Maurel P. Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **221**: 466-70.
- Juan D, Worwag EM, Schoeller DA, Kotake AN, Hughes RL, Frederiksen MC. Effects of dietary protein on theophylline pharmacokinetics and caffeine and aminopyrine breath tests. *Clin Pharmacol Ther* 1986; **40**: 187-94.
- Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* 1985; **40**: 457-76.
- Kalis B B-OC. A 3-month double-blind comparative study of ebastine (10 mg o.d), terfenadine (60 mg b.i.d) and placebo in the treatment of chronic urticaria. *Allergy* 1995; **50(Suppl)**: 380.
- Kall MA, Clausen J. Dietary effect on mixed function P450 1A2 activity assayed by estimation of caffeine metabolism in man. *Hum Exp Toxicol* 1995; **14**: 801-7.
- Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998; **8**: 283-9.
- Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000; **75**: 933-42.

- Kappas A, Alvares AP, Anderson KE, Pantuck EJ, Pantuck CB, Chang R, Conney AH. Effect of charcoal-broiled beef on antipyrine and theophylline metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1978; **23**: 445-50.
- Kappas A, Anderson KE, Conney AH, Alvares AP. Influence of dietary protein and carbohydrate on antipyrine and theophylline metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther* 1976; **20**: 643-53.
- Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey. *Jama* 2002; **287**: 337-44.
- Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999; **16**: 408-14.
- King BP, Leathart JB, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **55**: 625-9.
- King LM, Ma J, Srettanjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H, Zeldin DC. Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms. *Mol Pharmacol* 2002; **61**: 840-52.
- Kivisto KT, Griese EU, Fritz P, Linder A, Hakkola J, Raunio H, Beaune P, Kroemer HK. Expression of cytochrome P 450 3A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of normal tissue and lung tumours. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; **353**: 207-12.
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958; **75**: 376-86.
- Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 1108-14.
- Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994; **4**: 247-59.
- Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1871-8.
- Krecic-Shepard ME, Park K, Barnas C, Slimko J, Kerwin DR, Schwartz JB. Race and sex influence clearance of nifedipine: results of a population study. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **68**: 130-42.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383-91.
- Kupferschmidt HH, Ha HR, Ziegler WH, Meier PJ, Krahenbuhl S. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**: 20-8.
- Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, Zhang J, Schuetz EG. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 121-32.

- Lasseter KC, Dilzer SC, Vargas R, Waldman S, Noveck RJ. Pharmacokinetics and safety of ebastine in patients with impaired hepatic function compared with healthy volunteers: a phase I open-label study. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 121-9.
- Lee AJ, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17beta-estradiol to multiple metabolites by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome P450 3A4 and 3A5. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **298**: 420-32.
- Lee AJ, Mills LH, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT. NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **300**: 838-49.
- Lindell M, Karlsson MO, Lennernas H, Pahlman L, Lang MA. Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 493-9.
- Lobo J, Jack DB, Kendall MJ. The intra- and inter-subject variability of nifedipine pharmacokinetics in young volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; **30**: 57-60.
- Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2545-53.
- Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Johnsson G. Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; **49**: 61-7.
- Luria X. Comparative clinical studies with ebastine: efficacy and tolerability. *Drug Saf* 1999; **21 Suppl 1**: 63-7; discussion 81-7.
- Ma J, Ramachandran S, Fiedorek FT, Jr., Zeldin DC. Mapping of the CYP2J cytochrome P450 genes to human chromosome 1 and mouse chromosome 4. *Genomics* 1998; **49**: 152-5.
- Maenpaa J, Syngelma T, Honkakoski P, Lang MA, Pelkonen O. Comparative studies on coumarin and testosterone metabolism in mouse and human livers. Differential inhibitions by the anti-P450Coh antibody and metyrapone. *Biochem Pharmacol* 1991; **42**: 1229-35.
- Marino EL, Jansat JM, March MA, Lastra CF. Parametrization by nonlinear regression analysis of the active acid metabolite of ebastine using different weighting methods. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; **34**: 546-9.
- Maskalyk J. Grapefruit juice: potential drug interactions. *Cmaj* 2002; **167**: 279-80.
- Matsuda M, Mizuki Y, Terauchi Y. Simultaneous determination of the histamine H1-receptor antagonist ebastine and its two metabolites, carebastine and hydroxyebastine, in human plasma using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; **757**: 173-9.
- Matsuda M, Sakashita M, Mizuki Y, Yamaguchi T, Fujii T, Sekine Y. Comparative pharmacokinetics of the histamine H1-receptor antagonist ebastine and its active metabolite carebastine in rats, guinea pigs, dogs and monkeys. *Arzneimittelforschung* 1994; **44**: 55-9.
- McCune JS, Lindley C, Decker JL, Williamson KM, Meadowcroft AM, Graff D, Sawyer WT, Blough DK, Pieper JA. Lack of gender differences and large intrasubject variability in cytochrome P450 activity measured by phenotyping with dextromethorphan. *J Clin Pharmacol* 2001; **41**: 723-31.
- Mehta JL, Lopez LM. Hypertension in the elderly: pathophysiology and therapeutic implications. *Compr Ther* 1986; **12**: 50-8.

- Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet* 2002; **41**: 329-42.
- Merkel U, Sigusch H, Hoffmann A. Grapefruit juice inhibits 7-hydroxylation of coumarin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; **46**: 175-7.
- Merry C, Barry MG, Mulcahy F, Ryan M, Heavey J, Tjia JF, Gibbons SE, Breckenridge AM, Back DJ. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with zidovudine in HIV-infected patients. *Aids* 1997; **11**: F29-33.
- Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; **356**: 1667-71.
- Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; **37**: 269-96.
- Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR, Jr. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *Jama* 1990; **264**: 2788-90.
- Moss AJ, Morganroth J. Cardiac effects of ebastine and other antihistamines in humans. *Drug Saf* 1999; **21 Suppl 1**: 69-80; discussion 81-7.
- Mycek MJ HR, Champe PC. Absorption, distribution, and elimination of drugs. *Pharmacology, 2nd ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins* 2002: 1-15.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 1989; **19**: 1149-60.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1993; **12**: 1-51.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; **6**: 1-42.
- Nelson DR, Strobel HW. Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol* 1987; **4**: 572-93.
- Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 1999; **285**: 1276-9.
- Nolan L, O'Malley K. Adverse drug reactions in the elderly. *Br J Hosp Med* 1989; **41**: 446, 448, 452-7.
- Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 1964a; **239**: 2370-8.
- Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* 1964b; **239**: 2379-85.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **283**: 1552-62.
- Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, Casey G, Witte JS. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; **8**: 901-5.
- Peyri J VJ, Marrón J. Ebastine in chronic urticaria: a double-blind placebo-controlled study. *J Dermatol Treat* 1991; **2**: 51-53.

- Picado VC CG, Cistero BA, Cano CL, Sanz AA, Zayas SJM. Ebastine in perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy* 1991; **67**: 615-618.
- Piipari R, Savela K, Nurminen T, Hukkanen J, Raunio H, Hakkola J, Mantyla T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Anttila S. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *Int J Cancer* 2000; **86**: 610-6.
- Pirmohamed M, Madden S, Park BK. Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin Pharmacokinet* 1996; **31**: 215-30.
- Plummer SJ, Conti DV, Paris PL, Curran AP, Casey G, Witte JS. CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; **12**: 928-32.
- Proppe DG, Hoch OD, McLean AJ, Visser KE. Influence of chronic ingestion of grapefruit juice on steady-state blood concentrations of cyclosporine A in renal transplant patients with stable graft function. *Br J Clin Pharmacol* 1995; **39**: 337-8.
- Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 1986; **11**: 107-32.
- Pucci L, Lucchesi D, Chirulli V, Penno G, Johansson I, Gervasi P, Del Prato S, Longo V. Cytochrome P450 2J2 polymorphism in healthy Caucasians and those with diabetes mellitus. *Am J Pharmacogenomics* 2003; **3**: 355-8.
- Raimundo S FJ, Eichelbaum M, Griese E, Schwab M, Zanger UM. Elucidation of the genetic basis of the common "intermediate metabolizer" phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2000; **10**: 1-5.
- Rashid J, McKinstry C, Renwick AG, Dirnhuber M, Waller DG, George CF. Quercetin, an in vitro inhibitor of CYP3A, does not contribute to the interaction between nifedipine and grapefruit juice. *Br J Clin Pharmacol* 1993; **36**: 460-3.
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1225-9.
- Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997; **29**: 413-580.
- Roberts SM, James RC, Harbison RD, Grund VR. Histamine and hepatic glutathione in the mouse. *Life Sci* 1987; **40**: 2103-10.
- Rogers JF, Rocci ML, Jr., Haughey DB, Bertino JS, Jr. An evaluation of the suitability of intravenous midazolam as an in vivo marker for hepatic cytochrome P4503A activity. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**: 153-8.
- Rohatagi S, Gillen M, Aubeneau M, Jan C, Pandit B, Jensen BK, Rhodes G. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of ebastine after single and repeated dosing in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001; **39**: 126-34.
- Roses AD. Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet* 2000; **355**: 1358-61.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **67**: 48-56.
- Schmucker DL, Woodhouse KW, Wang RK, Wynne H, James OF, McManus M, Kremers P. Effects of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases. *Clin Pharmacol Ther* 1990; **48**: 365-74.

- Schubert W, Cullberg G, Edgar B, Hedner T. Inhibition of 17 beta-estradiol metabolism by grapefruit juice in ovariectomized women. *Maturitas* 1994; **20**: 155-63.
- Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**: 1011-8.
- Schuetz EG, Schuetz JD, Grogan WM, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Raucy J, Guzelian P, Gionela K, Watlington CO. Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1992; **294**: 206-14.
- Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys* 1989; **274**: 355-65.
- Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**: 107-21.
- Schwarz UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J Clin Invest* 2003; **33 Suppl 2**: 23-30.
- Shen DD, Kunze KL, Thummel KE. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **27**: 99-127.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **270**: 414-23.
- Shinderman M, Maxwell S, Brawand-Amey M, Golay KP, Baumann P, Eap CB. Cytochrome P4503A4 metabolic activity, methadone blood concentrations, and methadone doses. *Drug Alcohol Depend* 2003; **69**: 205-11.
- Simons FE, Simons KJ. The pharmacology and use of H1-receptor-antagonist drugs. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1663-70.
- Simons FE, Simons KJ. Clinical pharmacology of H1-antihistamines. *Clin Allergy Immunol* 2002; **17**: 141-78.
- Soons PA, Vogels BA, Roosemalen MC, Schoemaker HC, Uchida E, Edgar B, Lundahl J, Cohen AF, Breimer DD. Grapefruit juice and cimetidine inhibit stereoselective metabolism of nitrendipine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991; **50**: 394-403.
- Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **307**: 573-82.
- Tagawa M, Kano M, Okamura N, Higuchi M, Matsuda M, Mizuki Y, Arai H, Iwata R, Fujii T, Komemushi S, Ido T, Itoh M, Sasaki H, Watanabe T, Yanai K. Neuroimaging of histamine H1-receptor occupancy in human brain by positron emission tomography (PET): a comparative study of ebastine, a second-generation antihistamine, and (+)-chlorpheniramine, a classical antihistamine. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **52**: 501-9.
- Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* 1998; **21**: 1062-6.
- Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci* 1997; **61**: 2567-74.



- Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Daly AK. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; **76**: 1233-5.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 7735-8.
- Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**: 389-430.
- Topic E, Stefanovic M, Samardzija M. Association between the CYP2C9 polymorphism and the drug metabolism phenotype. *Clin Chem Lab Med* 2004; **42**: 72-8.
- Tsai WC, Tsai LM, Chen JH. Combined use of astemizole and ketoconazole resulting in torsade de pointes. *J Formos Med Assoc* 1997; **96**: 144-6.
- Tsujimoto G, Hashimoto K, Hoffman BB. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of drug therapy in old age. Part 1. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989; **27**: 13-26.
- van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002; **48**: 1668-71.
- Verster JC, Volkerts ER. Antihistamines and driving ability: evidence from on-the-road driving studies during normal traffic. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; **92**: 294-303; quiz 303-5, 355.
- Villard PH, Seree EM, Re JL, De Meo M, Barra Y, Attolini L, Dumenil G, Catalin J, Durand A, Lacarelle B. Effects of tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e, and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; **148**: 195-204.
- Vincent J, Liminana R, Meredith PA, Reid JL. The pharmacokinetics, antihistamine and concentration-effect relationship of ebastine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1988; **26**: 497-502.
- Vlahakos DV MA, Chilidou D, Zamanika C and Aliviztos, PA. Itraconazole-induced rhabdomyolysis and acute renal failure in a heart transplant recipient treated with simvastatin and cyclosporine. *Transplantation* 2002; **73**: 1962-1964.
- Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, Olopade OI, Weber BL, Rebbeck TR. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. Mutations in brief no. 191. Online. *Hum Mutat* 1998; **12**: 289.
- Warrington JS, Greenblatt DJ, von Moltke LL. The effect of age on P-glycoprotein expression and function in the Fischer-344 rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **309**: 730-6.
- Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 1994; **4**: 171-84.
- Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1029-36.
- Welling PG. Effects of food on drug absorption. *Annu Rev Nutr* 1996; **16**: 383-415.
- Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**: 201-5.
- Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. Comparative analysis of CYP3A

- expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 755-61.
- Williams JA, Cook J, Hurst SI. A significant drug-metabolizing role for CYP3A5? *Drug Metab Dispos* 2003; **31**: 1526-30.
- Wiseman LR, Faulds D. Ebastine. a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of allergic disorders. *Drugs* 1996; **51**: 260-77.
- Woolf TF, Jordan RA. Basic concepts in drug metabolism: Part I. *J Clin Pharmacol* 1987; **27**: 15-7.
- Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, Vandenbranden M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III<sub>A5</sub> (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990; **38**: 207-13.
- Wrighton SA, Ring BJ, Watkins PB, VandenBranden M. Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family. *Mol Pharmacol* 1989; **36**: 97-105.
- Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; **22**: 1-21.
- Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem* 1996; **271**: 3460-8.
- Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004; **5**: 243-72.
- Yamaguchi T, Hashizume T, Matsuda M, Sakashita M, Fujii T, Sekine Y, Nakashima M, Uematsu T. Pharmacokinetics of the H1-receptor antagonist ebastine and its active metabolite carebastine in healthy subjects. *Arzneimittelforschung* 1994; **44**: 59-64.
- Yamakoshi Y, Kishimoto T, Sugimura K, Kawashima H. Human prostate CYP3A5: identification of a unique 5'-untranslated sequence and characterization of purified recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **260**: 676-81.
- Yang CS, Brady JF, Hong JY. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. *Faseb J* 1992; **6**: 737-44.
- Yee GC, Stanley DL, Pessa LJ, Dalla Costa T, Beltz SE, Ruiz J, Lowenthal DT. Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet* 1995; **345**: 955-6.
- Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36059-62.
- Zeldin DC, Foley J, Boyle JE, Moomaw CR, Tomer KB, Parker C, Steenbergen C, Wu S. Predominant expression of an arachidonate epoxygenase in islets of Langerhans cells in human and rat pancreas. *Endocrinology* 1997a; **138**: 1338-46.
- Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 1997b; **51**: 931-43.
- Zeldin DC, Foley J, Ma J, Boyle JE, Pascual JM, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 1996; **50**: 1111-7.
- Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, Webber S, Ristich J, Dauber J, Iacono A, Grgurich W, Zaldonis D, McDade K, Zhang J, Burckart GJ. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004; **44**: 135-40.

- Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004; **36**: 57-104.
- Zhu B, Liu ZQ, Chen GL, Chen XP, Ou-Yang DS, Wang LS, Huang SL, Tan ZR, Zhou HH. The distribution and gender difference of CYP3A activity in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **55**: 264-9.

