



## TESIS DOCTORAL

**Fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán,  
genotipos *CYP2D6* y *CYP2C9* en la población ecuatoriana  
respecto de la española**

**ESTHER MACHÍN GARCÍA**

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

Badajoz, noviembre de 2012



## **TESIS DOCTORAL**

# **FENOTIPOS METABÓLICOS DE DEXTROMETORFANO Y LOSARTÁN, GENOTIPOS *CYP2D6* Y *CYP2C9* EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA RESPECTO DE LA ESPAÑOLA**

**ESTHER MACHÍN GARCÍA**

**Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica**

**Facultad de Medicina**

**CiCAB Centro de Investigación Clínica. Área de Salud de Badajoz.**

**SES Servicio Extremeño de Salud. CHUB Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz**

**Badajoz, noviembre de 2012**



Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

Área de Farmacología

Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura

**Adrián Llerena Ruiz**, Profesor Titular del Dpto. de Terapéutica Médico-Quirúrgica, Área de Farmacología, de la Universidad de Extremadura

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

**CERTIFICAMOS QUE:**

---

El trabajo de investigación titulado "***Fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, genotipos CYP2D6 y CYP2C9 en la población ecuatoriana respecto de la española***" que presenta ***Esther Machín García*** ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura y que cumple los requisitos para optar al grado de Doctor

Fdo: Adrián Llerena Ruíz

Pedro Dorado Hernández

Badajoz, noviembre de 2012

---

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LOS CITOCROMOS P450</b> .....	4
1.1. Variabilidad en el metabolismo de fármacos.....	4
1.2. Características generales de los citocromos P450.....	5
1.3. Polimorfismo metabólico de los citocromos P450.....	6
1.4. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450.....	7
<b>2. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2D6</b> .....	9
2.1. Citocromo P450 2D6 (CYP2D6).....	9
2.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2D6.....	10
2.3. Variabilidad interétnica del fenotipo metabólico CYP2D6: estudios de poblaciones.....	11
<b>3. POLIMORFISMO DEL GEN CYP2D6</b> .....	13
3.1. Bases moleculares del polimorfismo genético CYP2D6.....	13
3.2. Variabilidad interétnica del CYP2D6: estudios de poblaciones.....	16
3.3. Relación fenotipo – genotipo CYP2D6.....	19
3.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo CYP2D6.....	23
<b>4. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2C9</b> .....	24
4.1. Citocromo P450 2C9 (CYP2C9).....	24
4.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9.....	26
4.3. Variabilidad interétnica del fenotipo metabólico CYP2C9: estudio de poblaciones.....	28
<b>5. POLIMORFISMO DEL GEN CYP2C9</b> .....	29
5.1. Bases moleculares del polimorfismo genético CYP2C9.....	29
5.2. Variabilidad interétnica del CYP2C9: estudios de poblaciones.....	31
5.3. Relación fenotipo – genotipo CYP2C9.....	37
5.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo CYP2C9.....	38
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	41
<b>1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS</b> .....	42
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b> .....	49
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	49
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	51
<b>1. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	52
<b>2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN</b> .....	55
<b>3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS</b> .....	58
3.1. Análisis genéticos.....	58
3.2. Análisis cromatográficos.....	59
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	62
4.1. Análisis de los genotipos CYP2D6.....	62
4.2. Análisis de los genotipos CYP2C9.....	66
4.3. Análisis cromatográficos.....	66
<b>5. CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	73
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b> .....	74
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	76
<b>1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DEXTROMETORFANO Y GENOTIPOS CYP2D6 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA</b> .....	77
1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.....	77
1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	79

<b>2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS CYP2C9 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.....</b>	<b>85</b>
2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.....	85
2.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	89
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DEXTROMETORFANO Y GENOTIPOS CYP2D6 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO A LA ESPAÑOLA.....</b>	<b>98</b>
1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.....	98
1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	100
<b>2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS CYP2C9 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO A LA ESPAÑOLA.....</b>	<b>104</b>
2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.....	104
2.2. ESTUDIO II.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	106
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>1. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>113</b>
<b>2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>
<b>VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN.....</b>	<b>133</b>
<b>1. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>134</b>
<b>2. FINANCIACIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>136</b>
<b>1. INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>137</b>
<b>2. INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>139</b>
<b>3. INDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>141</b>
<b>X. PUBLICACIONES.....</b>	<b>143</b>

---

## RESUMEN

**Introducción:** España, debido a su situación geográfica, es la frontera con Europa para los extranjeros procedentes de África; por otro lado, debido a vínculos históricos y culturales con países iberoamericanos da lugar a que sea uno de los destinos prioritarios para los extranjeros de habla hispana. El país Iberoamericano con más residentes en nuestro país es Ecuador, que representa entre el 10-14 % de la población extranjera total (fuente INE). Esta población recibe tratamientos con las mismas pautas que se utilizan en la población española en su mayoría blancos europeos o caucásicos.

Se ha comprobado que existe variabilidad interétnica en el metabolismo de fármacos, por tanto al administrar las mismas dosis de un fármaco a personas pertenecientes a diferentes etnias podrían tener una respuesta diferente. Por tanto, el estudio de la variabilidad poblacional de las enzimas metabolizadoras de fármacos CYP2D6 y CYP2C9 (genotipos y fenotipos metabólicos) puede servir para determinar en qué manera las dosis recomendadas se podrían ajustar a una determinada población. Hasta la fecha no existe ningún estudio de este tipo realizado en la población ecuatoriana, y se desconocen las diferencias respecto de la española.

**Objetivos:** Los objetivos generales de la Tesis fueron describir en una población mestiza ecuatoriana los fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, los polimorfismos genéticos de *CYP2D6* y *CYP2C9* asociados, la relación entre ellos y compararlos con una población española.

**Material y Métodos:** En la presente Tesis se estudió una población de 118 voluntarios sanos mestizos de Ecuador para la determinación del fenotipo metabólico de dextrometorfano y polimorfismo genético *CYP2D6*. Se analizó otra población de 194 voluntarios sanos mestizos de Ecuador para la determinación del fenotipo metabólico de losartán y polimorfismo genético *CYP2C9*. Además se estudió un panel de 13 voluntarios sanos españoles para el desarrollo de un nuevo método de determinación de losartán y E-3174 en orina.

**Resultados y Discusión:** Se desarrollaron dos nuevos métodos de HPLC, uno con detección ultravioleta para la determinación de dextrometorfano y dextrorfano en plasma, y otro con detección por fluorescencia para la determinación de losartán y E-3174 en orina. El porcentaje de PM y UM para el metabolismo de dextrometorfano en la población de estudio fue 0.9% y 0%, respectivamente; menor en ambos casos a la población española. Las frecuencias alélicas de las variantes con actividad nula, reducida y multiplicadas del *CYP2D6* en la población de voluntarios sanos mestiza de Ecuador fueron del 14%, 5.1% y 0.8%, respectivamente. La frecuencia de las variantes nulas y las multiplicaciones fueron menores que en la población española, pero la frecuencia de alelos con actividad reducida fue mayor que en la población española. La frecuencia de las variantes *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* fueron del 5.4% y 1.5%, menores que en la población española. Además se ha encontrado una influencia del género sobre el metabolismo de losartán.

**Conclusión:** Por tanto, de acuerdo a los resultados de la presente tesis se puede concluir que existe una variabilidad interindividual en los fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, en los polimorfismos genéticos de *CYP2D6* y *CYP2C9* y la influencia de estos en el fenotipo metabólico en una población de voluntarios sanos mestiza de Ecuador. Se han encontrado diferencias entre la población ecuatoriana y la española. Estos resultados apoyan la variabilidad interétnica en el metabolismo de fármacos mediados por enzimas de gran relevancia clínica (*CYP2D6*, *CYP2C9*) en poblaciones en general y en las poblaciones hispanas en particular.

# I. INTRODUCCIÓN

	Página
<b>1. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LOS CITOCROMOS P450</b> .....	4
1.1. Variabilidad en el metabolismo de fármacos.....	4
1.2. Características generales de los citocromos P450.....	5
1.3. Polimorfismo metabólico de los citocromos P450.....	6
1.4. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450.....	7
<b>2. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2D6</b> .....	9
2.1. Citocromo P450 2D6 (CYP2D6).....	9
2.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2D6.....	10
2.3. Variabilidad interétnica del fenotipo metabólico CYP2D6: estudios de poblaciones.....	11
<b>3. POLIMORFISMO DEL GEN CYP2D6</b> .....	13
3.1. Bases moleculares del polimorfismo genético CYP2D6.....	13
3.2. Variabilidad interétnica del CYP2D6: estudios de poblaciones.....	16
3.3. Relación fenotipo – genotipo CYP2D6.....	19
3.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo CYP2D6.....	23
<b>4. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2C9</b> .....	24
4.1. Citocromo P450 2C9 (CYP2C9).....	24
4.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9.....	26
4.3. Variabilidad interétnica del fenotipo metabólico CYP2C9: estudio de poblaciones.....	28
<b>5. POLIMORFISMO DEL GEN CYP2C9</b> .....	29
5.1. Bases moleculares del polimorfismo genético CYP2C9.....	29
5.2. Variabilidad interétnica del CYP2C9: estudios de poblaciones.....	31
5.3. Relación fenotipo – genotipo CYP2C9.....	37
5.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo CYP2C9.....	38



## 1. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LOS CITOCROMOS P450

### 1.1. Variabilidad en el metabolismo de fármacos

En la práctica clínica se observa con frecuencia que pacientes tratados con la misma dosis de un fármaco presentan variabilidad en la respuesta terapéutica y en la aparición de efectos adversos. Esta variabilidad puede ser atribuible bien a factores farmacodinámicos o farmacocinéticos. Las diferencias individuales en los procesos de absorción, distribución, metabolismo o excreción pueden dar lugar a una variabilidad en las concentraciones plasmáticas del fármaco y/o metabolitos. Entre los procesos farmacocinéticos, el metabolismo es uno de los determinantes en la eliminación, y por tanto, de las concentraciones plasmáticas de fármaco y/o metabolitos. Por otra parte, en muchos casos la biotransformación de los fármacos resulta esencial para que estos cesen su actividad biológica, siendo este proceso un paso importante de la variabilidad en el efecto farmacológico. Las reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos se clasifican en reacciones de Fase I, que introducen o exponen un grupo funcional del fármaco original y reacciones de Fase II que conjugación entre el fármaco y el ácido glucurónico principalmente.

Entre las reacciones de oxidación de Fase I se encuentran las de hidroxilación mediadas por el sistema enzimático denominado citocromo P-450. Estas reacciones son determinantes en la eliminación de numerosos fármacos y xenobióticos en general. Por tanto la variabilidad en la actividad enzimática de este sistema es determinante de las diferencias interindividuales observadas en la respuesta a numerosos fármacos (Relling y Giacomini, 2005).

Las diferencias interindividuales en el metabolismo de fármacos están determinadas por factores ambientales y genéticos (Kalow, 1992; Heim y Meyer, 1992), siendo estos últimos en muchos de los casos, muy importantes. La Farmacogenética es la disciplina que estudia las bases genéticas que subyacen a las variaciones en el metabolismo y en la respuesta a los fármacos (Pickar y Rubinow, 2001).

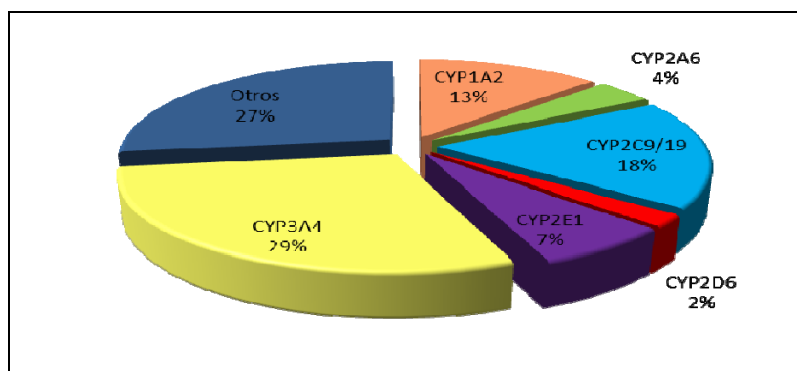
En los años 50 del pasado siglo, se describió la existencia de dos fenotipos metabólicos: acetiladores rápidos y lentos de isoniazida. Este fue uno de los primeros polimorfismos

metabólicos estudiado en el metabolismo de fármacos. A partir de la segunda mitad del siglo XX se estudia la variabilidad de la actividad enzimática de las isoenzimas del citocromo P-450. Está ampliamente aceptado que factores genético-ambientales pueden modificar la actividad de estas enzimas y ser causantes de diferencias en la concentración plasmática y, por tanto, en la respuesta terapéutica de los fármacos (Vesell, 1984; Pelkonen y Sotaniemi, 1987; LLerena y cols., 1996).

## 1.2. Características generales de los Citocromos P450

Los citocromos P-450 (CYP) son una superfamilia de hemoproteínas que catalizan distintas reacciones de óxido-reducción en Fase I. El nombre de citocromo P-450 se debe a que estas proteínas cuando son reducidas en presencia de dióxido de carbono (CO) presentan un espectro con un máximo de absorción en 450 nm. Los citocromos P-450 se encuentran localizados en las membranas del retículo endoplasmático liso de diferentes tejidos, principalmente en el hígado (Figura 1), aunque también se encuentran en glándulas como testículos y glándulas adrenales (Guengerich y cols., 1993).

**Figura 1.** Porcentaje aproximado de los principales citocromos P-450 (CYP) presentes en el hígado (Figura adaptada de Dorado, 2003).



Estas enzimas son monooxigenasas de función mixta y su actividad requiere un agente reductor (NADPH) y oxígeno molecular. En una reacción típica, una molécula de oxígeno es consumida (reducida) por cada molécula de sustrato. Un átomo de oxígeno se une al producto y el otro se une a dos átomos de hidrógeno, formándose una molécula de H<sub>2</sub>O

(Rang y cols., 1999). En este proceso intervienen dos enzimas: la citocromo P-450-NADPH reductasa (que actúa como transportador de electrones) y el citocromo P-450 (que lleva a cabo la reacción en el sustrato). Filogenéticamente, estas enzimas se encuentran presentes desde bacterias hasta humanos, exhibiendo un elevado nivel de conservación estructural y funcional (Kalow, 1992).

Para su clasificación, cada familia enzimática (designada por números arábigos) se divide en subfamilias (designadas por letras), de tal manera que las sucesiones o secuencias de proteínas que se incluyen dentro de la misma subfamilia deben ser idénticas en más del 55% de la composición de aminoácidos.

Las enzimas citocromo P-450 participan en la eliminación de xenobióticos (fármacos, carcinógenos, pesticidas, etc.) y en la degradación de sustancias producidas por el propio organismo (esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles A y D, alcaloides endógenos, etc.) (Kalow, 1992). En humanos, de los más de 50 CYPs conocidos, solo tres familias de enzimas (CYP1, CYP2 y CYP3) parecen tener una contribución relevante en el metabolismo de fármacos y de xenobióticos (Wrighton y Stevens 1992; González, 1992; Cholerton y cols., 1992; Hasler, 1999). Numerosas isoenzimas de estas familias presentan una gran variabilidad interindividual en su actividad catalítica, debida principalmente a influencias genético-ambientales (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 y 3A5) (Figura 1).

### **1.3. Polimorfismo metabólico de los Citocromos P450**

A la variabilidad en el material genético también se le denomina *polimorfismo* (del griego *poli* = muchos; *morfos* = forma), que se define como una secuencia del ADN (ácido desoxirribonucleico) con dos o más alelos, donde el alelo más raro tiene una frecuencia mayor del 1%; cuando una secuencia cumple con esta definición se dice que es un locus polimórfico. Si la frecuencia es más baja de este 1%, entonces es llamado un “caso raro” (Bertilsson, 1995; Kalow 1992).

El término “*polimorfismo genético*” se ha referido a la existencia de diferentes genotipos en una población, esta característica se hereda por un mecanismo mendeliano o monogénico recesivo de los alelos correspondientes (que ocuparán un mismo locus en el cromosoma)

(Llerena, 1988). Estas reacciones metabólicas dependientes de una enzima bajo control monogénico, conduce a que los parámetros metabólicos (aclaramiento total, índice de formación de metabolitos, vida media, concentraciones plasmáticas e índice metabólico) muestren una curva de distribución discontinua en una población (Llerena, 1988). Teóricamente, la distribución de fenotipos de un rasgo monogénico recesivo debería ser trimodal (homocigoto recesivo, heterocigoto y homocigoto dominante) con tres picos (Llerena, 1988). La razón que explicaría esa bimodalidad es que los heterocigotos y homocigotos dominantes no pueden ser separados funcionalmente por los métodos de fenotipación que se dispone en la actualidad, la distribución de las curvas están solapadas.

#### 1.4. Determinación de la actividad metabólica de los citocromos P450

La actividad catalítica de una enzima CYP puede ser determinada por una prueba de fenotipación. En esta prueba se mide la capacidad de metabolizar un fármaco que es específicamente metabolizado por la enzima CYP en cuestión. Dicha prueba consiste en la administración de una sola dosis de un fármaco test a un individuo, posteriormente se determinan las concentraciones del fármaco y su metabolito ya sea en plasma u orina (Nebert y cols., 1987; 1989). La evaluación del metabolismo de dicho fármaco se realiza mediante el cálculo del índice metabólico (IM), que puede definirse como:

$$IM = \text{Concentración de la dosis excretada del fármaco} / \text{Concentración de la dosis excretada como metabolito}$$

El IM refleja la actividad actual de esa enzima en específico. Jackson y cols. (1986) demostraron en simulación por ordenador que este índice es adecuado para evaluar la capacidad de una enzima para metabolizar un fármaco.

La capacidad metabólica del sistema de enzimas CYP no es igual en todos los miembros de una población, la conversión metabólica y la tasa de excreción de fármacos varían entre individuos. La existencia de polimorfismos se identificó inicialmente a nivel del fenotipo mediante estudios *in vivo*. Los primeros estudios de la acetilación de isoniazida en los años

50 y el de otros fármacos metabolizados por los CYPs en los años 70, encontraron diferencias fenotípicas en la cantidad del compuesto que se excretaba por una vía controlada mediante mecanismos polimórficos. Este fenómeno se ha identificado por la presencia de una distribución bimodal en la población, en la cual una de los modos corresponde a individuos con una capacidad de eliminación disminuida, los denominados portadores del fenotipo metabolizador lento (del inglés poor metabolizer: PM), la otra corresponde a los que poseen el fenotipo metabolizador rápido (del inglés extensive metabolizer: EM) (Kalow, 1992; Van der Weide y Steijns, 1999). Ambos términos nos parecen los más adecuados en idioma español para definir los términos ingleses “poor” y “extensive metabolizer” (LLerena, 1988). También se ha logrado describir la existencia de individuos con una capacidad de eliminación muy rápida, este metabolismo es denominado ultrarrápido (ultrarapid metabolizer: UM). Entre los CYPs polimórficos con una mayor implicación terapéutica está el CYP2D6, junto con CYP2C9, CYP2C19 y CYP1A2 (Kalow, 1992).

En la presente Tesis se evaluará el polimorfismo metabólico de dos de estas isoenzimas, el CYP2D6 y CYP2C9, las cuales participan en el metabolismo de un elevado número de fármacos.

## 2. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2D6

### 2.1. Citocromo P450 2D6 (CYP2D6)

El primer nombre de esta enzima fue el de debrisoquina hidroxilasa. La enzima CYP2D6 aparece en una etapa postnatal y su incremento se hace evidente una semana después del nacimiento. La isoenzima CYP2D6 comprende del 2 al 6% del contenido hepático total de los CYPs (Shimada y cols., 1994). También la podemos encontrar en menor cantidad en diferentes tejidos de intestino, riñón, placenta, glándula mamaria, pulmones y cerebro (Zanger y cols., 2004; Smith y cols., 1998; Kolars y cols., 1994; Philpot, 1991; Wheeler y Guenther, 1990). Aunque se expresa en más bajos niveles comparada con otras enzimas CYPs humanas, CYP2D6 es de gran importancia, considerando el número de pasos metabólicos que esta cataliza para la biotransformación de fármacos (Kalow, 1992). Además, algunos estudios mostraron que CYP2D6 cataliza la biotransformación oxidativa de pesticidas organofosforados como el paratión y el diazinon (Sams y cols., 2000), y que contribuye en la activación de una nitrosamina específica del humo del tabaco, que es considerada como un potente carcinógeno (Crespi y cols., 1991).

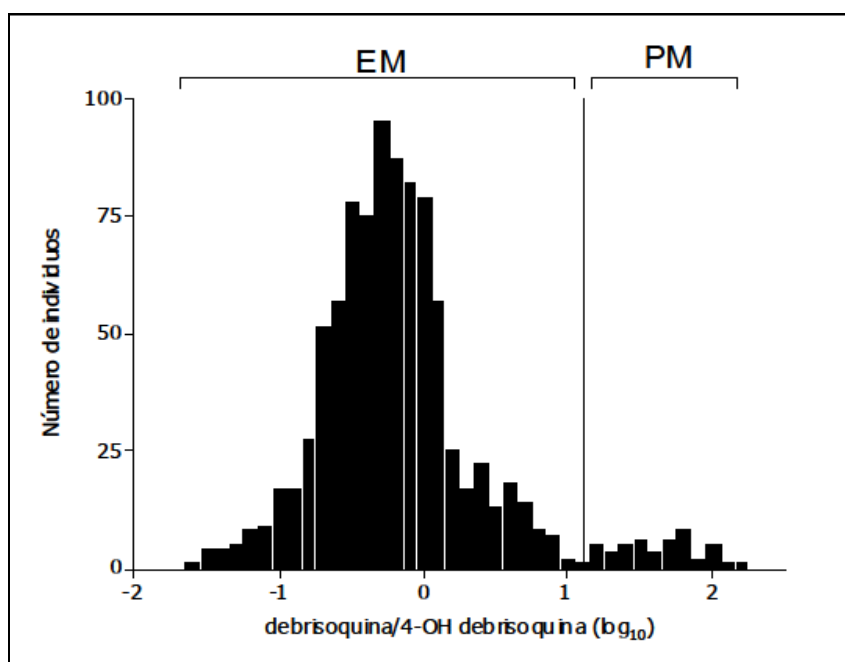
El polimorfismo genético del *CYP2D6* es uno de los citocromos P450 más ampliamente estudiados. Fue descubierto independientemente por dos grupos a finales de los años 70. Mahgoub y cols. (1977) estudiaron el metabolismo de debrisoquina, un fármaco antihipertensivo y, simultáneamente, Eichelbaum y cols. (1979) estudiaron el metabolismo de esparteína, un fármaco antiarrítmico. Ambos grupos observaron la existencia de polimorfismo en la reacción enzimática de la 4-hidroxilación de debrisoquina y en la N1-oxidación de esparteína. Se definieron dos tipos de individuos: PMs y EMs. A partir de estudios realizados en familias se determinó la herencia autosómica recesiva del fenotipo PM (Evans y cols., 1980). En un estudio posterior se demostró que los polimorfismos metabólicos de debrisoquina y esparteína se debían a la variabilidad interindividual de la enzima debrisoquina hidroxilasa, denominada posteriormente CYP2D6 (Eichelbaum y cols., 1982). La determinación de la capacidad metabólica del CYP2D6 ha sido realizada a partir de la evaluación de diferentes fármacos-test, tales como debrisoquina, esparteína,

dextrometorfano, metoprolol, etc. (Henthorn y cols., 1989; Alván y cols., 1990; Llerena y cols., 1996).

## 2.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2D6

La prueba más ampliamente utilizada ha sido el fenotipo metabólico de la 4-hidroxilación de debrisoquina, que permite diferenciar los individuos en dos categorías: metabolizadores lentos y rápidos (PMs y EMs). En esta prueba, la capacidad metabolizadora es evaluada tras la administración de debrisoquina, a partir del cociente entre el porcentaje de fármaco (debrisoquina) y de su metabolito (4'-OH debrisoquina) recuperados en orina se calcula el IM. La distribución que presenta este IM en voluntarios sanos es bimodal, habiéndose calculado en poblaciones caucásicas la separación entre ambos grupos de población (antimoda) en 1.1 ( $\log_{10}$  IM) (Evans y cols., 1980; Evans y cols., 1983). Aquellos individuos con un IM mayor o igual a 1.1 ( $\log_{10}$ ), son clasificados como PMs, mientras que el resto son EMs (Figura 2).

**Figura 2.** Distribución del  $\log_{10}$  del IM debrisoquina/4'-OH debrisoquina en 925 voluntarios sanos españoles (Llerena y cols., 1993) (línea vertical: antimoda en 1.1).



**EM**= metabolizadores rápidos; **PM**= metabolizadores lentos.

### **2.3. Variabilidad interétnica en el fenotipo metabólico CYP2D6: estudios de poblaciones**

La frecuencia del fenotipo PM presenta variabilidad interétnica, habiéndose calculado entre el 5-10% en poblaciones blancas (europeas, americanas, australianas, etc.) (Alván y cols. 1990). Al estudio inicial de Mahgoub y cols. (1977) en la población británica, le siguieron otros trabajos en poblaciones para determinar la frecuencia de PMs (LLerena y cols., 1996). Como se ha mencionado anteriormente, para ello se han utilizado diferentes sustratos como debrisoquina, esparteína, dextrometorfano y metoprolol. Debrisoquina fue el fármaco más utilizado, pero actualmente en muchos estudios se prefiere utilizar dextrometorfano (Tabla I) por su buena disponibilidad y un amplio margen de seguridad ya que tiene menor riesgo de efectos adversos en comparación con debrisoquina (Schmid y cols., 1985; Hildebrand y cols., 1989; Henthorn y cols., 1989; Yu y Haining, 2001; Wojtczak y cols., 2007).



**Tabla I.** Frecuencia (%) de Metabolizadores Lentos de dextrometorfano en diferentes estudios en voluntarios sanos.

	Población	N	PM (n)	PM (%)	Referencia
<b>ÁFRICA</b>					
Burundi	Burundés negros	100	5	5.0	Nsabiyumva y cols., 1991
Gabón	Gaboneses	154	3	2	Panserat y cols., 1999
<b>AMÉRICA</b>					
Canadá	Indígenas nativos	95	1	1.1	Nowak y cols., 1997
Canadá	Inuit	90	3	3.3	Jurima-Romet y cols., 1997
EE.UU.	Norteamericanos	280	17	6.1	Straka y cols., 1995
EE.UU.	Norteamericanos	208	15	7.2	Gaedigk y cols., 1999
EE.UU.	Norteamericanos	143	7	4.9	Wan y cols., 2001
EE.UU.	Norteamericanos	206	10	4.8	Chou y cols., 2003
EE.UU.	Norteamericanos mezcla	518	35	6.7	Guttendorf y cols., 1990
EE.UU.	Afroamericanos	99	6	6.1	Marinac y cols., 1995
EE.UU.	Afroamericanos	181	7	3.9	He y cols., 1999
EE.UU.	Afroamericanos	154	4	2.7	Wan y cols., 2001
EE.UU.	Afroamericanos	225	16	7.1	Gaedigk y cols., 2002
EE.UU.	México-americanos	285	9	3.2	Mendoza y cols., 2001
EE.UU.	México-americanos	50	3	6	Casner, 2005
México	Mestizos mexicanos	100	10	10	López y cols., 2005
México	Mestizos mexicanos	110	6	6.8	Sosa-Macias y cols., 2006
México	Indígenas tepehuanos	55	0	0	Lares-Asseff y cols., 2005
Uruguay	Uruguayos	165	12	7.3	Estévez y cols., 1996
Uruguay	Uruguayos	302	22	7.3	Estévez y cols., 1997
<b>ASIA</b>					
China	Chinos	175	1	0.6	Lane y cols., 1996
Laos	Hmong de Laos (Laosiano)	203	18	8.9	Straka y cols., 1995
Irán	Iraníes	200	5	2.5	Afshar y cols., 2005
India	Caucásicos Aryan del norte	100	3	3	Lamba y cols., 1998
India	Hindúes del sur	156	5	3.2	Mamidi y cols., 1999
India	Keralite del sur	104	5	4.8	Abraham y cols., 2000a
India	Karnataka	100	4	4.0	Abraham y cols., 2000b
India	Tamiles	139	5	3.6	Abraham y cols., 2001
India	Andhra Pradesh	111	2	1.8	Abraham y cols., 2000b
Japón	Japoneses	98	1	1.0	Tateishi y cols., 1999

N= número de individuos; PM(n)= número de metabolizadores lentos

**Tabla I (continuación).** Frecuencia (%) de Metabolizadores Lentos de dextrometorfano en diferentes estudios en voluntarios sanos.

	Población	N	PM (n)	PM (%)	Referencia
<b>EUROPA</b>					
Alemania	Alemanes	450	46	10.22	Hildebrand y cols., 1989
España	Españoles	146	15	10	Henthorn y cols., 1989
Francia	Franceses	103	4	3.9	Larrey y cols., 1987
Francia	Franceses	132	4	3.0	Jacqz y cols., 1988
Francia	Franceses	110	11	10	Funck-Brentano y cols., 1992
Francia	Franceses	120	11	9.2	Duche y cols., 1993
Francia	Franceses mezcla	419	21	5	Funck-Brentano y cols., 2005
Holanda	Holandeses	4301	344	8	Tamminga y cols., 1999
Italia	Italianos	246	11	4.5	Spina y cols., 1994
Polonia	Polacos	85	8	9.4	Wojtczak y cols., 2007
Polonia	Polacos	104	10	9.6	Skretkowicz y cols., 2008
Suecia	Suecos	611	68	11.1	Hägg y cols., 2001
Suiza	Suizos	268	24	9	Schmid y cols., 1985

N= número de individuos; PM (n)= número de metabolizadores lentos.

### 3. POLIMORFISMO DEL GEN *CYP2D6*

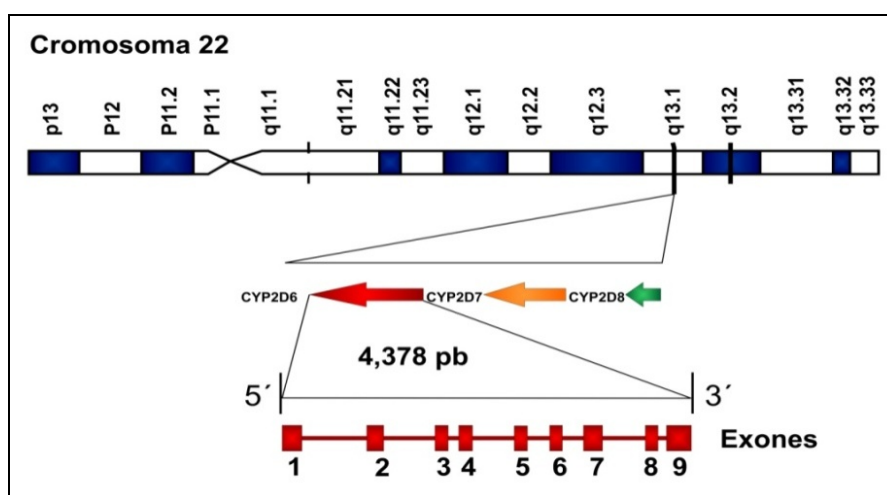
#### 3.1. Bases moleculares del polimorfismo genético *CYP2D6*

Eichelbaum y cols. (1987) en un estudio de asociación, secuenciaron el gen que codifica para la debrisoquina hidroxilasa en el cromosoma 22 y lo asociaron con el factor sanguíneo P1. Independientemente, otro grupo (González y cols., 1988a) usaron ADN complementario (ADNc) humano del *CYP2D6*, células somáticas híbridas de ratón-humano y hámster-humano para secuenciar el locus *CYP2D6* en el cromosoma 22. Al compararlo encontraron una similitud del 71% y 73% en sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente (Berecz, 2001; Dorado, 2003). En el hígado de individuos PMs, fueron encontradas algunas variantes de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) del *CYP2D6* con diferentes longitudes (González y cols., 1988b). Después de clonar y secuenciar el gen *CYP2D6* (Kimura y cols., 1989) fue posible la búsqueda de mutaciones en individuos PMs y el desarrollo de pruebas específicas de técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica) (por sus siglas en inglés, RFLP), así como el análisis de

polimorfismos en la conformación de cadena sencilla seguida de la secuenciación (Hasler y cols., 1999; Pai y cols., 2004; Heim y Meyer, 1990; 1991; Daly y cols., 1990).

El gen *CYP2D6* se localiza en el brazo largo del cromosoma 22, en la región 22q13.1 (Zanger y cols., 2004). Dos genes altamente homólogos a este, *CYP2D7* y *CYP2D8* están también presentes en el locus *CYP2D* (Figura 3), localizados en una región contigua de aproximadamente 45 kb (Kimura y cols., 1989; Eichelbaum, 1988). Los genes *CYP2D* están formados por 9 exones y 8 intrones (Meyer y Zanger, 1997). *CYP2D8* es considerado como un pseudogen y no contiene un marco de lectura abierto (González y Meyer, 1991; Kimura y cols., 1989; Heim y Meyer, 1992). *CYP2D7* es más similar a *CYP2D6* que a *CYP2D8*, su secuencia codificante contiene una mutación que lo inactiva, la inserción (T138) en el primer exón, provoca un cambio del marco de lectura y una terminación prematura de la traducción (Kimura y cols., 1989). Sin embargo, Pai y cols. (2004) reportaron que dicha mutación modifica al codón de paro UAG por GAG, y se encontró en cerebro humano un ARNm específico derivado de *CYP2D7* (Huang y cols., 1997; Pai y cols., 2004). Además, se han identificado niveles similares de transcritos del *CYP2D6* y de *CYP2D7/8* expresados en hígado humano (Endrizzi y cols., 2002).

**Figura 3.** Representación esquemática del Locus *CYP2D* en el cromosoma 22 (Figura adaptada de Maglott y cols., 2005).



El gen *CYP2D6* es extremadamente polimórfico. En la actualidad han sido descritas más de 100 variantes alélicas con sus respectivas subvariantes ([www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)).

Estas variantes genéticas pueden dar lugar a proteínas con una baja actividad enzimática (*CYP2D6*\*9, \*10, \*17, \*29 o \*41) o a isoenzimas que, debido a una delección o defecto de “splicing”, carecen totalmente de funcionalidad (*CYP2D6*\*3, \*4, \*5, \*6, \*36). Las variantes alélicas de este gen más frecuentes en poblaciones caucásicas son, por este orden, las denominadas *CYP2D6*\*1 (“wild type”, wt o silvestre), *CYP2D6*\*2, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5, *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*10 y *CYP2D6*\*6 (Gaedigk y cols., 1999; LLerena y cols., 2012).

Este gen también puede presentarse en multiplicidad de copias (*CYP2D6*\*1xN, \*2xN, \*35xN, etc.) (Tabla II). Los individuos que presenten varias copias de alelos funcionales tendrán un metabolismo aumentado, denominándose UMs (Bertilsson y cols., 1993a).

**Tabla II.** Variantes alélicas del gen *CYP2D6* más frecuentes en poblaciones europeas, asiáticas y africanas (Dorado, 2003).

Variante alélica	Proteína	Cambio de Nucleótido	Efecto	Actividad <i>in vivo</i>	Referencia
<i>CYP2D6</i> *1	CYP2D6.1	Ninguno	Ninguno	Normal	Kimura y cols., 1989
<i>CYP2D6</i> *2	CYP2D6.2	Varios	R296C; S486T	Normal	Johansson y cols., 1993
<i>CYP2D6</i> xN	CYP2D6.	--	N genes activos	Incrementada	Dahl y cols., 1995a
<i>CYP2D6</i> *3	CYP2D6.3	2549A>del	Frame-shift	Ninguna	Kagimoto y cols., 1990
<i>CYP2D6</i> *4	CYP2D6.4	1846G>A	Splicing	Ninguna	Kagimoto y cols., 1990
<i>CYP2D6</i> *5	CYP2D6.5	<i>CYP2D6</i> del	<i>CYP2D6</i> del	Ninguna	Gaedigk y cols., 1991
<i>CYP2D6</i> *6	CYP2D6.6	1707T>del		Ninguna	Saxena y cols., 1994
<i>CYP2D6</i> *10	CYP2D6.10	100C>T	P34S	Disminuida	Yokota y cols., 1993
<i>CYP2D6</i> *17	CYP2D6.17	1023C>T	T107I	Disminuida	Masimirembwa y cols., 1996

**N**=número de copias; **A**= adenina; **G**= guanina; **C**=citocina; **T**= timina; **del**= delección

Gaedigk y cols. en 2008 clasificaron las variantes alélicas según su actividad en lo que denominaron “activity score”. Según esta actividad se le asignaría una puntuación que variará si esta es normal, aumentada o disminuida (Tabla III). Por tanto, el genotipo de un individuo tendría un valor asignado de actividad que sería la suma de la puntuación de sus dos alelos.

**Tabla III.** Valores asignados a cada alelo del gen CYP2D6 (Gaedigk y cols., 2008).

Valor asignado a cada alelo	Alelos <i>CYP2D6</i>
0	*3, *4, *4xN, *5, *6, *7, *16, *36, *40, *42, *56B
0.5	*9, *10, *17, *29, *41, *45, *46
1	*1, *2, *35, *43, *45xN
2	*1xN, *2xN, *35xN

N= número de copias

### 3.2. Variabilidad interétnica del *CYP2D6*: estudios de poblaciones

Se ha comprobado en diferentes estudios, la existencia de variabilidad interétnica en la frecuencia de variantes alélicas del *CYP2D6*, generalmente, en poblaciones caucásicas europeas y sus descendientes. El 71% de los alelos son funcionales y los no funcionales representan el 26% de la variabilidad, principalmente por la variante *CYP2D6*\*4. En asiáticos y sus descendientes más cercanos, los alelos funcionales representan sólo el 50% de la frecuencia alélica del *CYP2D6* y el 41% tienen una alta frecuencia de alelos con una función reducida por la presencia del *CYP2D6*\*10, dando lugar a un “enlentecimiento” de estas poblaciones en relación a los caucásicos. Comparativamente, existe una baja frecuencia del *CYP2D6*\*10 en poblaciones indígenas del norte (Canadá), centro y sur de América. La frecuencia de alelos funcionales en africanos y afro-americanos, es aproximadamente del 50% y ambas poblaciones tienen una función reducida de alelos (35%), principalmente producido por el alelo *CYP2D6*\*17. Sin embargo, los afro-americanos tienen una media de frecuencia de alelos no funcionales dos veces superior a la encontrada en africanos (14.5% contra el 6.3%) (Bradford, 2002). El alelo *CYP2D6*\*17 y, posiblemente, otras variantes pueden desempeñar un papel importante en la variación del fenotipo metabólico *CYP2D6* en poblaciones negras (Bradford y cols., 1998).

En las poblaciones caucásicas de Norteamérica (Tabla IV), las frecuencias alélicas calculadas coinciden con datos publicados previamente en poblaciones caucásicas francesas y alemanas (Tabla IV), observándose que la variante no funcional más frecuente en este grupo poblacional es la \*4 y la variante \*17 está casi ausente en su totalidad en poblaciones caucásicas.

La duplicación/multiplicación de los alelos *CYP2D6*\*1 o \*2 se han identificado en algunas poblaciones hispanas, mientras que la multiplicación de *CYP2D6*\*4 solamente se ha evaluado en españoles, cubanos y colombianos (Tabla IV).

En **poblaciones hispanas**, observamos que dentro de las variantes no funcionales presentes, la variante *CYP2D6*\*4 es la más frecuente. Dentro de las variantes de función disminuida, la variante \*10 es más frecuente que la \*17. Además, la mayor frecuencia de alelos con función incrementada se observa en población mexicana, cubana-caucásica y española (Tabla IV), siendo del 0% en la población nicaragüense (LLerena y cols., 2012).

**Tabla IV.** Frecuencias alélicas del *CYP2D6* en diferentes poblaciones.

	Población	n	*3	*4	*5	*6	*10	*17	*1xN o 2xN	Referencia
<b>ÁFRICA</b>										
Etiopía	Etíopes	122	0	1.2	3.3	-	8.6	9.0	16.0	Aklillu y cols., 1996
Gabón	Gaboneses	154	0	0	0.7	-	0.0	24.0	-	Panserat y cols., 1999
Ghana	Ghaneses	193	0.3	7.0	0.6	0	3.1	27.7	1.6	Griese y cols., 1999
Tanzania	Tanzanos	106	0	0.9	6.1	0	3.8	17.0	3.3	Wennerholm y cols., 1999
Tanzania	Tanzanos	106	0.5	1.4	3.3	-	-	20.3	-	Dandara y cols., 2001
Zimbabwe	Zimbabuenses	80	0	2.5	3.8	-	5.6	34.0	2.5	Masimirembwa y cols., 1996
<b>AMÉRICA</b>										
Canadá	Inuits	152	0	7.5	-	0	2.2	-	-	Jurima-Romet y cols., 1997
Chile	Mapuches	84	0.0	3.6	4.2	0	1.8	0	0	Muñoz y cols., 1998
Colombia	Mestizos	121	1.2	19.4	0.8	0	0	1.6	0.8	Isaza y cols., 2000
Colombia	Ngawbe	105	0.0	17.1	0	0.5	17.5	-	-	Jorge y cols., 1999
Colombia	Embera	136	0.0	14.0	0	1.1	6.9	-	-	Jorge y cols., 1999
Cuba	Caucásicos	130	0	14.6	1.9	0.8	0.4	2.7	3.8	LLerena y cols., 2012
Cuba	Mestizos	126	0	14.3	1.6	1.2	0.8	10.2	4.7	LLerena y cols., 2012
EE.UU.	Caucásicos	208	1.0	17.5	3.8	1.0	1.9	0.2	0.9	Gaedigk y cols., 1999
EE.UU.	Caucásicos	143	1.4	19.9	2.1	-	8.0	0.3	1.4	Wan y cols., 2001
EE.UU.	Caucásicos	206	1.0	20.9	2.7	0.9	0.7	0	2.0	Chou y cols., 2003
EE.UU.	Afroamericanos	127	0.2	8.5	6.0	-	-	-	-	Evans y cols., 1993
EE.UU.	Afroamericanos	246	0.6	7.3	6.9	-	4.0	26.0	2.4	Leathart y cols., 1998
EE.UU.	Afroamericanos	154	0.3	7.8	6.2	-	7.5	14.6	1.9	Wan y cols., 2001
EE.UU.	Afroamericanos	251	0.2	5.4	6.6	0.4	3.6	21.3	3.8	Gaedigk y cols., 2002
EE.UU.	Mexicanos	349	0.3	10.3	2.3	-	7.4	0.7	1.0	Mendoza y cols., 2001
México	Mestizos	243	1.4	11.2	2.7	-	12.3	1.7	12.8	López y cols., 2005
México	Mestizos	264	0.2	10.0	1.7	0.4	2.8	0.2	0.8	Luo y cols., 2005
México	Mestizos	110	0.9	13.1	-	0	2.3	-	-	Sosa-Macías y cols., 2006
México	Tepehuano	85	0.0	0.6	-	0	0	-	-	Sosa-Macías y cols., 2006
Nicaragua	Mestizos	98	0	0.142	0.046	0	0.031	0	0.020	LLerena y cols., 2012
<b>ASIA</b>										
Arabia Saudí	Saudíes	101	0	3.5	1.0	0	3.0	3.0	10.4	McLellan y cols., 1997
China	Chinos	119	-	0	4.6	-	64.7	-	-	García-Barceló y cols., 2000
India	Tamiles	106	0	6.6	0.9	-	20.3	-	-	Adithan y cols., 2003
Israel	Israelíes	161	1.0	9.4	2.4	-	7.6	4.3	5.0	Luo y cols., 2004
Japón	Japoneses	206	0	0.2	4.5	-	38.1	0	1.0	Nishida y cols., 2000
Japón	Japoneses	98	0	0.5	6.1	-	40.8	0	0	Tateishi y cols., 1999
Japón	Japoneses	162	0	0.0	6.2	-	38.6	0	-	Kubota y cols., 2000
Malasia	Malayos	107	-	2.8	5.1	-	49.5	0.5	0.9	Teh y cols., 2001
Turquía	Turcos	404	0	11.3	1.4	0.7	6.0	1.1	5.5	Aynacioglu y cols., 1999

n= número de individuos; N= número de copias

**Tabla IV (continuación).** Frecuencias alélicas del *CYP2D6* en diferentes poblaciones.

	Población	n	*3	*4	*5	*6	*10	*17	*1xN o 2xN	Referencia
<b>EUROPA</b>										
Alemania	Alemanes	589	2.0	20.7	2.0	0.9	1.5	-	2.0	Sachse y cols., 1997
Alemania	Alemanes	195	1.0	19.5	4.1	1.3	2.0	0	1.6	Griese y cols., 1998
Croacia	Croatas	200	2.8	14.0	1.0	1.5	-	-	2.0	Bozina y cols., 2003
Dinamarca	Daneses	276	2.2	22.6	-	2	-	-	-	Pedersen y cols., 2005
España	Españoles	258	1.2	11.6	1.9	1.6	-	-	3.3	Agúndez y cols., 1994
España	Españoles	147	1.0	20.1	4.1	-	-	-	5.9	Bernal y cols., 1999
España	Españoles	105	0.9	13.8	3.3	0.9	1.9	-	4.2	Menoyo y cols., 2005
España	Españoles	142	0	16.9	1.4	6.7	2.1	0	3.9	LLerena y cols., 2006
España	Españoles	327	0.5	18.5	1.4	3.1	2.0	0	4.1	LLerena y cols., 2012
Francia	Franceses	672	1.8	18.9	7.3	1.4	1.4	0.1	-	Marez y cols., 1997
Francia	Franceses	309	0.2	33.4	-	1.9	-	-	-	Halling y cols., 2005
Holanda	Holandeses	765	1.8	18.4	-	0.4	-	-	-	Tamminga y cols., 2001
Italia	Italianos	360	0.7	15.3	3.4	1.4	-	-	4.2	Scordo y cols., 2004
Polonia	Polacos	300	1.3	23.0	-	-	-	-	-	Niewinski y cols., 2002
Rusia	Rusos	290	1.0	18.2	2.4	1.2	4.2	-	2.2	Gaikovitch y cols., 2003

n= número de individuos; N= número de copias

### 3.3. Relación fenotipo – genotipo *CYP2D6*

La relación fenotipo – genotipo *CYP2D6* presenta ciertas controversias, en parte relacionadas con las diferencias interétnicas en la frecuencia de variantes alélicas y los fenotipos metabólicos. No todas las variantes alélicas del gen *CYP2D6* expresarán enzimas con distinto fenotipo. El hecho de que la actividad enzimática se vea alterada en mayor o menor medida, dependerá del tipo de alteración genética y del lugar del gen donde esta se produzca. Existe, por tanto, un solapamiento en la relación fenotipo – genotipo.

En población caucásica alrededor del 7% tienen alelos deficientes de *CYP2D6* y ausencia de la enzima *CYP2D6*. Los alelos \*3, \*4 y \*6, portadores de una mutación defectuosa, se han asociado con una actividad deficiente del *CYP2D6* y consecuentemente con un fenotipo PM (Marez y cols., 1997). Sin embargo, es necesario señalar que en este estudio no solo se estudiaron voluntarios sanos, sino también pacientes con diversas patologías. En población sana de Estonia en base a los alelos *CYP2D6*\*3 y \*4 se predijo el fenotipo, todos los PMs de debrisoquina tenían dos alelos defectuosos (Marandi y cols., 1996). Posteriormente, en un



estudio de población alemana con voluntarios sanos y pacientes, el 86% de los PMs tenían variantes *CYP2D6*\*3, \*4, \*5, \*6 y \*15 (Sachse y cols., 1997). En estas poblaciones se realizó un estudio de fenotipación con esparteína, observándose que todos los fenotipos PM tenían dos alelos no funcionales (\*4/\*4, \*4/\*5 y \*4/\*6) (Griese y cols., 1998). Leathart y cols. (1998), plantean en su estudio que el 71.9% de los PM caucásicos tenían variantes \*3, \*4 y \*5 con dos alelos defectuosos y más recientemente, Pedersen y cols. (2005), plantean que el 92.8% de los PM de esparteína, tienen variables \*3, \*4 y \*6.

En varios estudios de poblaciones caucásicas (Gaedigk y cols., 1999; Armstrong y cols., 1994; Niewinski y cols., 2002; Pedersen y cols., 2005) se observó una excelente relación entre el genotipo y el fenotipo *CYP2D6*, sin embargo, en un estudio posterior entre afro-americanos (Gaedigk y cols., 2005) se observa que la relación fenotipo – genotipo es menos exacta, probablemente por la aparición de cuatro alelos funcionales que parecen ser responsables del fenotipo EM y por consiguiente una relación fenotipo – genotipo discordante.

En poblaciones africanas la variante *CYP2D6*\*17 es responsable de la disminución de la actividad de *CYP2D6*, dicha variante es la más frecuente entre los EM (Panserat y cols., 1999). En población tanzana se estudiaron los efectos de los alelos \*17 y \*29 sobre la actividad enzimática y la especificidad de sustrato por la correlación entre el genotipo *CYP2D6* y el fenotipo con cuatro fármacos-test (codeína, debrisoquina, dextrometorfano y metoprolol) en comparación con suecos. Se encontraron diferencias en la disposición de los cuatro sustratos entre los tanzanos y suecos, que fueron causadas por la presencia de dichas variantes alélicas (Wennerholm y cols., 1999). En individuos afro-americanos portadores de las variantes \*2 y \*17 la media del IM fue más alta que en individuos caucásicos (Gaedigk y cols., 2002).

Así se ha planteado que la baja actividad del *CYP2D6* en afro-americanos está determinada por las variantes \*4, \*5 y \*17 y en caucásicos por la variante \*4 y \*4xN (Wan y cols., 2001). Sin embargo, en otro estudio de población africana se encontró un sujeto *CYP2D6*wt/wt con un fenotipo PM de debrisoquina y esparteína (Griese y cols., 1999). Además la escasa actividad metabólica en ghaneses no puede ser explicada únicamente por la alta frecuencia del alelo \*17, ya que se observa una media alta del IM de esparteína entre los EM con genotipo wt/wt. Esto demuestra que la baja actividad de *CYP2D6* es en parte atribuible a la

presencia de dichas variantes alélicas que tienen una alta frecuencia en esta población en comparación con la caucásica, pero también es un indicativo de que aún existe desconocimiento de otros alelos no funcionales.

En las poblaciones china y japonesa, el alelo \*10 constituye la mayor causa de disminución de la actividad CYP2D6 (Roh y cols., 1996). Las variantes alélicas *CYP2D6\*10* y *CYP2D6\*36* codifican enzimas inestables, lo que provoca una disminución en la actividad catalítica. Su alta frecuencia (51% y 37%, respectivamente) en población oriental podría explicar los IM tan altos observados entre los EM en estas poblaciones (Johansson y cols., 1994). Además en los estudios de población japonesa, se observa que los homocigotos \*10/\*10 muestran un IM más alto que los homocigotos *wt/wt* y que los heterocigotos *wt/\*10*. Aproximadamente el 20% de la población japonesa muestra una baja actividad del CYP2D6 por individuos homocigotos \*10 (Tateishi y cols., 1999).

La ausencia de la variante *CYP2D6\*4* es una de las posibles causas de la baja incidencia de PM en poblaciones orientales (Bertilsson y cols., 1992; Johansson y cols., 1994). Los IM en los EM son más altos en poblaciones orientales que en poblaciones blancas europeas (Bertilsson y cols., 1992; Nakamura y cols., 1985; Dahl y cols., 1995b). En otro estudio (Kubota y cols., 2000), muestran que los alelos \*5 y \*14 son alelos defectuosos y responsables del 83% de los PM. A pesar de la baja frecuencia del fenotipo PM en la población japonesa, solo el alelo \*5 representa el 45% de los PM. Además, al igual que en otros estudios, en poblaciones asiáticas la mutación \*10 es la principal responsable del aumento del IM en PMs.

En comparación con otros grupos, existen pocos estudios realizados en **poblaciones hispanas**. En una población México-americana, el 50% de los PM fueron homocigotos *CYP2D6\*4* y todos los sujetos con dos alelos inactivos tenían muy disminuida la actividad enzimática. En concreto, el 63% de los PM portaban las variantes inactivas \*4 y \*5. Además, ninguno de los sujetos clasificados como EM, tenían más de un alelo no funcional (Mendoza cols., 2001). Posteriormente, en otro estudio de población mexicana (López y cols., 2005) se observó una disminución en la media del IM de dextrometorfano (actividad enzimática aumentada) relacionado con un mayor número de genes activos *CYP2D6*. También en mexicanos (Luo y cols., 2005) se observa que los alelos inactivos *CYP2D6\*4*, \*5, \*6 y \*10 son

los principales responsables de la disminución de la capacidad de oxidación de dextrometorfano. Recientemente, en un estudio de dos poblaciones cubanas (cubanos caucásicos y mestizos) y una nicaragüense (LLerena y cols., 2012) se ha observado que el alelo sin actividad que se presentaba con más frecuencia fue el alelo \*4. Además, en la población nicaragüense, el alelo con actividad disminuida más frecuente fue el alelo \*10, mientras que en población de cubanos mestizos fue el alelo \*17 (LLerena y cols., 2012). En la población española (LLerena y cols., 2012), se observó que el alelo con actividad nula más frecuente fue también el alelo \*4.

Existen individuos que portan alelos deficientes de *CYP2D6* que implican la pérdida de la actividad de la enzima *CYP2D6*. Diversos estudios realizados en poblaciones caucásicas han demostrado que sujetos con un sólo alelo funcional del *CYP2D6*, tienen un IM aumentado comparado con los sujetos que tienen dos alelos funcionales (Evans y Relling, 1991). Sin embargo, existen individuos que son portadores de duplicaciones o multiplicaciones funcionales del gen *CYP2D6*, causando un aumento de la actividad, en varios estudios se plantea que la duplicación y multiplicación del *CYP2D6* dará lugar a un fenotipo UM.

En una población de voluntarios sanos de Estonia se observó una alta actividad enzimática de debrisoquina debido a una duplicidad de alelos *CYP2D6* (Marandi y cols., 1996). En un estudio de población sueca solamente el 40% de la población estudiada con un fenotipo UM eran portadores de duplicaciones/multiplicaciones del *CYP2D6*, el 60% de los UMs no fueron identificados por genotipación (Dahl y cols., 1995a). En una población alemana, los llamados UM no se distinguían del grupo, no había una separación basada en la distribución del IM (Griese y cols., 1998). La alta frecuencia de individuos UMs observados en la población española (LLerena, 1988; LLerena y cols., 1996) ha sido explicada por la alta frecuencia de multiplicaciones del gen *CYP2D6*. Sin embargo, la relación causa-efecto del mayor número de copias con un fenotipo UM de *CYP2D6* permanece sin aclarar. De este modo, puede que existan otras variantes genéticas del *CYP2D6* que sean la causa del incremento en la actividad *CYP2D6*.

### 3.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo CYP2D6

El citocromo CYP2D6 está implicado en el metabolismo de fármacos de gran relevancia en la práctica clínica, tanto por la frecuencia de su uso como por la importancia de sus efectos terapéuticos y/o sus potenciales reacciones adversas (Tabla V).

Los fármacos en cuyo metabolismo participa CYP2D6, tienen la particularidad de ser lipofílicos y de tener una o más bases nitrogenadas. En diferentes estudios en paneles de voluntarios sanos seleccionados por su fenotipo/genotipo metabólico, se han comprobado las diferencias en las concentraciones plasmáticas y/o eliminación de numerosos fármacos (Tabla V; González, 2006). Así, en general se ha demostrado que la concentración plasmática será mayor y la eliminación más lenta en PMs que en EMs, tras la administración de una dosis única de un fármaco metabolizado por CYP2D6.

**Tabla V.** Algunos fármacos cuyo metabolismo es catalizado por CYP2D6 (ampliada de González, 2006).

Antipsicóticos	Antidepresivos	β-bloqueantes	Analgésicos y antitusivos	Otros
Clorpromazina	Amitriptilina	Bisoprolol	Codeína	Debrisoquina
Haloperidol	Clomipramina	Metoprolol	Dextrometorfano	Esparteína
Risperidona	Imipramina	Timolol	Tramadol	Metadona
Tioridacina	Desipramina	Propranolol	Hidrocodona	Metanfetamina
Zuclopentixol	Nortriptilina	Alprenolol	Etilmorfina	Cinarizina
Perfenazina	Fluoxetina	Carvedilol	Norcodeína	Prometazina
Levomepromazina	Paroxetina	Bupranolol	Oxicodona	Tamoxifeno
Clozapina	Velanfaxina			Fenformina
Olanzapina	Citalopram			Dolasetrón
Aripiprazol	Mianserina			Dexfenfluramina
Bromperidol	Mirtazapina			Nicergolina
Zotepina	Trimipramina			

## 4. POLIMORFISMO METABÓLICO CYP2C9

### 4.1. Citocromo P450 2C9 (CYP2C9)

La subfamilia CYP2C en humanos está formada por cuatro miembros principales que son: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19 (Goldstein, 2001). Todos los miembros de esta subfamilia tienen polimorfismos genéticos. La identificación de sus diferentes miembros ha sido bastante controvertida, puesto que presentan una homología de hasta un 96% (Goldstein y De Morais, 1994), lo que ha hecho difícil poder diferenciar las isoformas, tanto a niveles moleculares como a niveles funcionales (Siest y cols., 2007).

Históricamente, el primer polimorfismo descubierto en la subfamilia CYP2C fue el de mefenitoína hidroxilasa (CYP2C19) en los años 80, observándose la existencia de dos fenotipos metabólicos, EMs y PMs (Goldstein, 2001). El rasgo PM es heredado como un rasgo autosómico recesivo (Goldstein, 2001). El polimorfismo de CYP2C9 fue publicado en el metabolismo de tolbutamida y fenitoína a principios de la década de los 70 (Goldstein, 2001). Subsecuentemente, el polimorfismo de tolbutamida se demostró que era debido a un polimorfismo genético (Goldstein, 2001).

La proteína CYP2C9 está compuesta por 490 aminoácidos, con un tamaño de aproximadamente 55 KDa (Goldstein y de Morais, 1994). CYP2C9 se expresa fundamentalmente en hígado, en niveles que son los más altos entre las enzimas CYP2C y representa alrededor del 20% del contenido hepático (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Es también detectable a un nivel de expresión muy inferior en intestino y páncreas (Dorado, 2003). No está presente en esófago, estómago o riñón (De Waziers y cols., 1990). Miembros de la subfamilia CYP2C, como CYP2C8 y CYP2C18, han sido identificados en cerebro humano (McFayden y cols., 1998; Klose y cols., 1999). Esto sugiere que otros miembros de esta misma subfamilia, como CYP2C9, podrían estar también presentes en tejido cerebral. También, se ha publicado su implicación en el metabolismo de neurotransmisores con participación en funciones importantes del Sistema Nervioso Central: serotonina y adrenalina (Gervasini y cols., 2001).

La familia CYP2C metaboliza en humanos un amplio número de agentes terapéuticos a través de tres enzimas, CYP2C9, CYP2C8 y CYP2C19 (Suarez-Kurtz y Sergio, 2007). CYP2C9 y CYP2C19 se diferencian entre sí en tan sólo 43 de sus 490 aminoácidos (Goldstein y De Morais, 1994). Sin embargo, las dos enzimas tienen una especificidad de sustrato completamente diferente (Xie y cols., 2002).

La enzima CYP2C9 está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 10% de todos los fármacos. Proporciona la principal vía para metabolizar anticoagulantes, anti-convulsivantes y anti-diabéticos incluyendo algunos con márgenes terapéuticos estrechos, por ejemplo: S-warfarina, tolbutamida y fenitoína (Dorado y cols., 2007; Schwarz, 2003), numerosos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el diclofenaco, piroxicam, tenoxicam y fármacos anticancerígenos como el tamoxifeno (Zhou y cols., 2010). CYP2C9 también media la 3-hidroxilación de benzo[ $\alpha$ ]pirenos (B[ $\alpha$ ]P) y la activación metabólica de diversos PAH-dioles (hidrocarburos policíclicos aromáticos) a metabolitos activos en tasas más lentas que las enzimas CYP1 (Shimada, 2006). Además, CYP2C9 participa en la generación de varios compuestos endógenos relacionados con la inflamación y angiogénesis (9,10-epoxy-12-octadecanoate y 12,13-epoxy-9-octadecanoate) (Fortuny y cols., 2006). Otros sustratos son el ácido araquidónico y linoléico (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). CYP2C9 participa también en la oxidación de otros sustratos endógenos como son progesterona y testosterona (Yamazaki y Shimada, 1997), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Wang y cols., 2004). Hay una gran variación interindividual en la actividad CYP2C9 en la población, esta variación puede ser parcialmente causada por factores ambientales, produciendo la inducción de los receptores CAR y/o PXR (Ingelman-Sundberg y cols., 2007), que influyen en su regulación.

Estudios *in vitro* han mostrado que la afinidad al sustrato de CYP2C9 es variable. Para explicar esto, se ha sugerido diferencias en la especificidad del sustrato entre las tres enzimas CYP2C9: CYP2C9.1, CYP2C9.2 y CYP2C9.3 (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Por consiguiente, para algunos sustratos, esto es inmutable, pero con algunos fármacos como acenocoumarol, la actividad es severamente disminuida (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). La proteína CYP2C9.3, contiene una substitución de aminoácido en la región conservada I359L, que provoca una reducción significativa de la actividad catalítica con solamente

alrededor del 10% del aclaramiento intrínseco de la enzima silvestre para la mayor parte de sustratos CYP2C9 (Ingelman-Sundberg y cols., 2007).

#### 4.2. Determinación del fenotipo metabólico CYP2C9

Se ha evaluado en diversos estudios *in vitro* la implicación del CYP2C9 en el metabolismo de fármacos como flurbiprofeno, torsemida, celecoxib, tenoxicam, piroxicam y ácido mefenámico (Dorado, 2003). El fenotipo CYP2C9 se ha estudiado *in vivo* utilizando diferentes fármacos-test tales como la tolbutamida, fenitoína, losartán, diclofenaco, flurbiprofeno y mefenitoína, ya sea individualmente o como parte de varios “cócteles” para la evaluación de la capacidad de metabolización de fármacos de los miembros de la familia CYP (Turpault y cols., 2009).

Una de las razones por las cuales existen pocos estudios de poblaciones es la falta de fármacos-tests adecuados para la fenotipación *in vivo*, como por ejemplo, la fenitoína y tolbutamida, que presentan numerosos riesgos e inconvenientes. Dentro de las alternativas con menos riesgos está el diclofenaco, un fármaco AINE, cuyo principal metabolito en plasma y en orina es el 4'-OH diclofenaco, encontrándose en menor medida otros monohidroxi metabolitos como son el 3'-OH diclofenaco y el 5'-OH diclofenaco (Davies y Anderson, 1997). En hepatocitos humanos, CYP2C9 es el responsable casi en exclusiva de la 4'-hidroxilación del diclofenaco, con una participación de alrededor del 99.5%. Igual ocurre con el 3'-OH diclofenaco, sintetizado casi totalmente (99.9%) por intervención del CYP2C9 (Bort y cols., 1999). En la formación del 5'-OH diclofenaco participan otras isoformas de la familia CYP2C como CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19, además de CYP2B6 (Bort y cols., 1999) y CYP3A4 (Tang y cols., 1999, Shen y cols., 1999). Dorado y cols. (2003a) desarrollaron un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para medir diclofenaco y sus metabolitos en orina. En él, se evaluó la reproducibilidad del IM urinario diclofenaco/4'-OH diclofenaco en un período de 9 a 12 meses (Dorado y cols., 2003b).

También se analizó la frecuencia de las variantes alélicas de *CYP2C9* y evaluó el impacto del genotipo *CYP2C9* sobre el metabolismo de diclofenaco en una población española de voluntarios sanos, encontrando que el IM de diclofenaco/4'-OH diclofenaco, pero no los IM

de diclofenaco/3'-OH diclofenaco y diclofenaco/5'-OH diclofenaco, están relacionados con el genotipo *CYP2C9* (Dorado y cols., 2003c). Los datos concuerdan con estudios previos que muestran que la variante alélica *CYP2C9\*3* parece ser la causa de la reducción en la capacidad de hidroxilación de *CYP2C9* (Dorado y cols., 2003b). *CYP2C8* también está involucrada en la 5'-hidroxilación de diclofenaco, mientras, *in vitro*, la 4'-hidroxilación y 3'-hidroxilación parecen estar mediados principalmente por *CYP2C9*. Dorado y cols., (2008), realizaron el primer estudio *in vivo* que muestra la influencia de los genotipos *CYP2C8* sobre el metabolismo del diclofenaco. El enlace de desequilibrio entre los alelos *CYP2C8\*3* y *CYP2C9\*2* fueron además confirmados en la población española (Dorado y cols., 2008).

El losartán es un fármaco antihipertensivo, del que han sido identificados seis metabolitos de losartán (Lo y cols., 1995). Losartán es principalmente metabolizado por *CYP2C9* a un metabolito intermedio (E-3179) y por último a ácido carboxílico de losartán (E-3174), con la participación de *CYP3A4* (Stearns y cols., 1995; Yasar y cols., 2001; Yun y cols., 1995). Estas dos enzimas, por lo tanto, son capaces de metabolizar losartán y E-3179 a E-3174. Aunque, solamente el 14% de losartán es metabolizado a E-3174, el área bajo la curva (AUC, de las siglas en inglés) de este último es entre 4 y 8 veces más alta que la de losartán y por tanto se le considera el principal responsable de la actividad farmacológica (Lo y cols., 1995). Fluconazol, que es un inhibidor de *CYP3A4* y *CYP2C9*, se ha comprobado que disminuye el metabolismo de losartán a E-3174 (Kaukonen y cols., 1998; Kaizerad y cols., 1997). Sin embargo, itraconazol, que es un inhibidor selectivo de *CYP3A4*, no tiene un efecto significativo en el metabolismo de losartán *in vivo* (Kaukonen y cols., 1998; Kaizerad y cols., 1997).

El E-3174, presenta actividad farmacológica en voluntarios sanos. El efecto del genotipo *CYP2C9* sobre el metabolismo de losartán ha sido puesto de manifiesto en un caso clínico. Un individuo con el genotipo *CYP2C9\*3/\*3* convirtió menos del 1% de la dosis administrada de losartán a E-3174 (McCrea y cols., 1999). Posteriormente, el efecto del genotipo *CYP2C9* en la farmacocinética de losartán *in vivo* ha sido descrito en población caucásica sueca y española (Yasar y cols., 2002a; Dorado, 2003), donde se demostró que el alelo *CYP2C9\*3* está asociado con una disminución en la formación de E-3174 a partir de losartán. Este fármaco parece ser un buen fármaco test para la determinación de la actividad metabólica del *CYP2C9*.



### 4.3. Variabilidad interétnica del fenotipo metabólico CYP2C9: estudio de poblaciones

La variabilidad interétnica de la actividad del CYP2C9 ha sido muy poco estudiada, aunque pueden observarse diferencias entre distintas poblaciones estudiadas (Tabla VI).

**Tabla VI.** Estudios de la actividad CYP2C9 en poblaciones realizados con diferentes fármacos test.

País	N	Fármaco test	% PM	Referencia
Australia	63	Tolbutamida	1.6	Page y cols., 1991
Australia	106	Tolbutamida	0	Veronese y cols., 1993
España	260	Diclofenaco	0	Dorado y cols., 2003c
Turquía	85	Losartán	0	Babaoglu y cols., 2004
Suecia	126	Losartán	0	Sandberg y cols., 2004

**N** = número de individuos; **%PM**. = Porcentaje de PMs

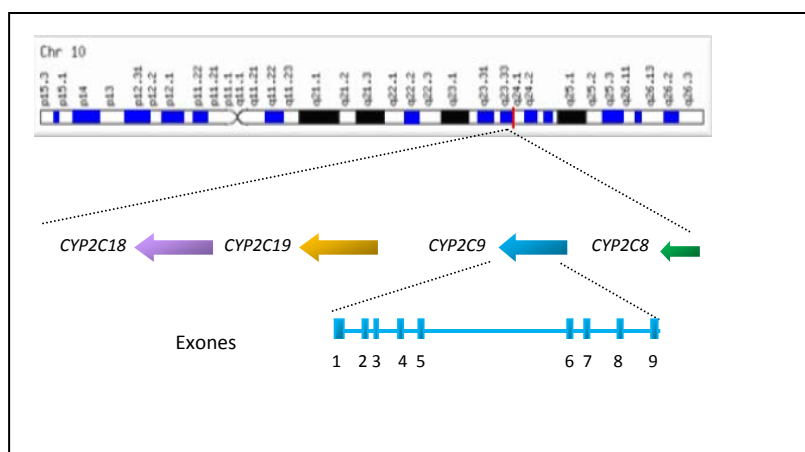
Los primeros estudios demostraron una distribución trimodal de la actividad CYP2C9, que fue posteriormente cuestionada. Uno de los primeros métodos validados para el estudio de poblaciones fue el IM de tolbutamida; sin embargo, la utilización de este fármaco nunca está exenta del riesgo de hipoglucemia como efecto adverso. Otros de los fármacos test que se ha estudiado son el diclofenaco (Dorado y cols., 2003c) y el losartán (Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004), aunque hasta la fecha, el bajo número de estudios en población sana con sustratos CYP2C9, en comparación al CYP2D6, supone un desconocimiento mayor de la relación de los fenotipos metabólicos CYP2C9 y de estos con las diferentes variantes alélicas de este gen. Por otro lado, no hay ningún estudio realizado en poblaciones hispanas (a excepción de la española) en la que se haya evaluado la actividad del CYP2C9 en voluntarios sanos. Es por ello, que uno de los estudios planteados en este trabajo de Tesis Doctoral será un estudio de la determinación del fenotipo metabólico de una población ecuatoriana usando losartán como fármaco test.

## 5. POLIMORFISMO DEL GEN *CYP2C9*

### 5.1. Bases moleculares del polimorfismo genético *CYP2C9*

El gen humano que codifica para la proteína *CYP2C9* ha sido encontrado en el cromosoma 10, en la región 10q24.2, y tiene aproximadamente 55 kb de longitud (Xie y cols., 2002) (Figura 4). El gen *CYP2C9* es polimórfico y, hasta el momento, han sido descritas 35 diferentes variantes alélicas (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>). Su ADNc posee 9 exones y 6 sitios de reconocimiento de sustrato (SRSs) (Gotoh, 1992). Las mutaciones que presenta el gen *CYP2C9* son puntuales, estando la mayoría localizadas en el exón 7, aunque también se localizan en los exones 3 y 5 (Tabla VII).

**Figura 4.** Representación de locus *CYP2C* dentro del cromosoma 10.



La regulación del *CYP2C9* ocurre principalmente al nivel de transcripción. La región promotora del gen *CYP2C9* contiene una secuencia de 15 pb que presenta una alta homología con una secuencia consenso de inducción por barbitúricos descrita en los genes *CYP102*, *CYP2B1* y *CYP2B2* (Dorado, 2003). Se ha sugerido la posible implicación de los receptores PXR y/o CAR en la regulación de la expresión del *CYP2C9* (Gerbai-Chaloin y cols., 2002).

**Tabla VII.** Algunas de las diferentes variantes alélicas del gen *CYP2C9* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>).

Variante alélica	Proteína	Cambio en nucleótido	Efecto	Exón	Actividad enzimática in vivo	Actividad Enzimática in vitro	Referencia
*1	CYP2C9.1	No	-	-	↔	↔	Romkes y cols., 1991
*2	CYP2C9.2	430C>T	R144C (Arg <sub>144</sub> Cys)	3		↓	Crespi y Millers, 1997
*3	CYP2C9.3	1075A>C	I359L (Ile <sub>359</sub> Leu)	7	↓	↓	Sullivan-Klose y cols., 1996
*4	CYP2C9.4	1076T>C	I359T (Ile <sub>359</sub> Thr)	7			Imai y cols., 2000
*5	CYP2C9.5	1080C>G	D360E (Asp <sub>360</sub> Glu)	7		↓	Dickmann y cols., 2001
*6	CYP2C9.6	818delA	Frame shift	5	Ninguna		Kidd y cols., 2001

↔= actividad normal; ↓= actividad reducida.

Alrededor de 30 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por su siglas en inglés) se han descrito en la región son regulatorias y codificantes de *CYP2C9* (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Actualmente, hay menos de siete alelos *CYP2C9* cuya actividad se ha estudiado *in vivo* (Dorado y cols., 2007). El alelo más común considerado como el tipo “silvestre”, es denominado *CYP2C9\*1* (Dorado y cols., 2007). Las variantes alélicas del *CYP2C9* tienen una diferente repercusión funcional. Cinco variantes de *CYP2C9* codifican proteínas con una actividad disminuida (*CYP2C9\*2*, \*3, \*4, \*5 y \*13). Sin embargo, los polimorfismos que modifican principalmente el funcionamiento de *CYP2C9* parecen ser dos variantes: *CYP2C9\*2*, que contiene una sustitución Arg144Cys (430C>T; R144C) en el exón 3 (CGT>TGT) y *CYP2C9\*3* (I359L) en el exón 7 (ATT>CTT) (1075A>C; Ile359Leu), ambas producen enzimas con actividad disminuida (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Para muchos sustratos, individuos heterocigotos que tienen la variante *CYP2C9\*3* tienen aproximadamente 50% del total aclaramiento oral silvestre e individuos homocigotos *CYP2C9\*3* tienen una reducción de 5 a 10 veces (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). Con respecto a *CYP2C9\*2*, se encontró un efecto significativo en el aclaramiento de S-warfarina, acenocoumarol, tolbutamida y celecoxib, pero no para otros fármacos (Ingelman-Sundberg y cols., 2007). El alelo *CYP2C9\*4* (1076T>C; Ile359Thr) y el alelo *CYP2C9\*5* (1080C>G; Asp360Glu) muestran un metabolismo alterado de diclofenaco *in vitro* (Van Sacháís., 2005). Los cambios de nucleótido en los alelos *CYP2C9\*3*, \*4 y \*5 afectan a dos aminoácidos muy cercanos Ile<sub>359</sub> y Asp<sub>360</sub> (Van Sacháís, 2005). Por tanto, a priori, estas variantes darán lugar a enzimas con una afinidad por el sustrato alterada (Sullivan-Klose y cols., 1996; Imai y cols., 2000; Dickmann y cols., 2001). También ha sido identificada una variante, denominada *CYP2C9\*6* (818delA), es un alelo nulo verdadero, que presenta una delección cerca del extremo 3' del exón 5, concretamente

en la adenina 818, que produce un codón de paro prematuro por lo que codifica una proteína que es inactiva (Kidd y cols., 2001; Dorado y cols., 2007; Van Schaik, 2005).

## 5.2. Variabilidad interétnica del *CYP2C9*: estudios de poblaciones

Se ha observado la existencia de diferencias en la frecuencia con la que se presentan las diferentes variantes alélicas del *CYP2C9* en poblaciones con distintos orígenes étnicos. Las variantes alélicas más frecuentes son las denominadas *CYP2C9\*1* (“silvestre”), *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*. En la frecuencia de distribución de los alelos *CYP2C9\*2* y *\*3* los genotipos manifiestan una estructura poblacional.

En las poblaciones caucásicas estudiadas se ha observado la existencia de una heterogeneidad en la frecuencia del alelo ***CYP2C9\*2***, entre un 8.8% y un 16.5% en población caucásica (Aithal y cols., 1999; Allabi y cols., 2003; Bodin y cols., 2005; Bozina y cols., 2003; Burian y cols., 2002; Dorado y cols., 2003; Gaikovitch y cols., 2003c; García-Martín y cols., 2001; Halling y cols., 2005; Pedersen y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004; Scordo y cols., 2001; 2004; Stubbins y cols., 1996; Xie y cols., 2002; Yasar y cols., 1999). En población turca se ha observado una frecuencia del alelo *CYP2C9\*2* de un 10% (Aynacioglu y cols., 1999; Babaoglu y cols., 2004; Yilmaz y cols., 2001) (Tabla VIII).

En poblaciones africanas se ha encontrado que la frecuencia del alelo *CYP2C9\*2* es del 3% (Van Schaik, 2005), en poblaciones etíopes es del 4.3% (Scordo y cols., 2001) y en poblaciones afro-americanas es del 2.5% (Dickmann y cols., 2001; Sullivan- Klose y cols., 1996). Sin embargo, en poblaciones de indígenas africanos benineses esta variante no ha sido encontrada. En asiáticos (coreanos y japoneses), *CYP2C9\*2* tampoco ha sido detectada (Yoon y cols., 2001; Nasu y cols., 1997; Kimura y cols., 1998). En el caso de la población china solo ha sido detectado en un individuo (Yang y cols., 2003), en el resto de las poblaciones chinas no se ha encontrado (Gaedigk y cols., 2001; Wang y cols., 1995; Yu y cols., 2004) (Tabla VIII).

En el caso del alelo ***CYP2C9\*3***, las poblaciones que presentan una frecuencia más alta son las caucásicas, que se sitúan entre el 5% y el 16.8% (Aithal y cols., 1999; Allabi y cols., 2003;

Bodin y cols., 2005; Bozina y cols., 2003; Burian y cols., 2002; Dorado y cols., 2003c; Gaikovitch y cols., 2003; García-Martín y cols., 2001; Halling y cols., 2005; Pedersen y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004; Scordo y cols., 2001; 2004; Stubbins y cols., 1996; Xie y cols., 2002; Yasar y cols., 1999). Las frecuencias alélicas más altas encontradas en poblaciones asiáticas para este alelo, han sido del 4.9% en una población china (Gaedigk y cols., 2001), 2.1% en japoneses (Nasu y cols., 1997) y del 1.1% en coreanos (Yoon y cols., 2001). La población etíope presenta una frecuencia del 2.3% (Scordo y cols., 2001) y en población negra se ha encontrado una frecuencia del 1.3% (Van Schaik, 2005). Sin embargo, en indígenas africanos benineses no ha sido detectada (Allabi y cols., 2003) (Tabla VIII).

Ambos alelos, *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, no se encontraron en una población inuit canadiense, a pesar de que este grupo étnico tiene ancestros asiáticos, lo que hubiera predicho la existencia de, al menos, el alelo *CYP2C9\*3* (Gaedigk y cols., 2001) (Tabla VIII).

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

La variante alélica ***CYP2C9\*5*** se describió por primera vez en una población afro-americana, siendo su frecuencia del 1.7% (Dickmann y cols., 2001). También se ha descrito la presencia de este alelo en una población de negros africanos, con una frecuencia del 0.8% (Yasar y cols., 2002b) y del 1.8% en indígenas africanos benineses (Allabi y cols., 2003). En la población caucásica sólo se ha encontrado en un estudio (Van Schaik, 2005), mientras que en otros estudios no ha sido reportada (Allabi y cols., 2003; Dickmann y cols., 2001; Llerena y cols., 2004), tampoco ha sido posible identificarla en las poblaciones orientales de Corea, y en etíopes (Yasar y cols., 2002b) (Tabla VIII).

El alelo ***CYP2C9\*6***, fue descrita en afro-americanos con una frecuencia del 0.6%, sin embargo, no pudo ser encontrado en caucásicos (Van Schaik, 2005; Kidd y cols., 2001; Llerena y cols., 2004), chinos (Yu y cols., 2004). Por último, la variante alélica *CYP2C9\*11* se

ha detectado en población belga con una frecuencia del 0.4% y del 2.7% en indígenas africanos benineses (Allabi y cols., 2003) (Tabla VIII).

### **5.2.1. Variabilidad interétnica del CYP2C9 en poblaciones hispanas**

En **poblaciones hispanas** no hay muchos estudios hasta la fecha. La variante *CYP2C9\*2* ha sido reportada en una población de origen hispano (Xie y cols., 2002), que presentó una frecuencia para este alelo del 12%. En poblaciones mexicanas se han encontrado con frecuencias del 6% y 10% (Aguilar y cols., 2008; Machorro-Lazo y cols., 2003), y en población México-americana una frecuencia del 8% (Llerena y cols., 2004), comparable a poblaciones caucásicas, aunque más alta que las encontradas en poblaciones afro-americanas y africanas negras. En la población boliviana (Bravo-Villalta y cols., 2005) y en la brasileña (Vianna-Jorge y cols., 2004) se han observado unas frecuencias del alelo *CYP2C9\*2* del 4.8% y 9%, respectivamente. Sin embargo, al estratificar la población brasileña por grupos, negros, mestizos y blancos las frecuencias que se encontraron fueron del 4%, 7% y 12%, respectivamente. En las poblaciones mexicanas mestizas y tepehuanas la frecuencia de la variante \*2 fue del 7% y 1%, respectivamente. Este resultado está en concordancia con la baja frecuencia de poblaciones orientales y por tanto con la hipótesis de la ancestría oriental de estas poblaciones. Por otro lado, la frecuencia más alta de este alelo (16%) lo encontramos en la población española (Dorado y cols., 2003c; 2011).

Por otro lado, la variante *CYP2C9\*3* se ha encontrado en una población hispana con una frecuencia del 3.4% (Xie y cols., 2002), valores más bajos que los observados en poblaciones caucásicas. Los mexicanos del oeste, mexicano-americanos (Aguilar y cols., 2008; Llerena y cols., 2004) y bolivianos (Bravo-Villalta y cols., 2005) manifiestan frecuencias en el intervalo de 3-6% para el alelo *CYP2C9\*3*. Estos intervalos están por debajo de la frecuencia observada en españoles (10%) (Dorado y cols., 2007), son más altas que en asiáticos. En un estudio realizado en 331 voluntarios sanos brasileños que fueron clasificados como negros, mestizos o blancos, se encontraron frecuencias del 7% para el grupo en general, y del 3%, 7% y 8% para los subgrupos negros, mestizos y blancos, respectivamente (Vianna-Jorge y cols., 2004). La distribución de los alelos varió a través de los grupos de color, ambas variantes alélicas fueron 2.5-3 veces más bajas en brasileños negros que en blancos (Tabla

VIII). El genotipo homocigoto *CYP2C9\*3* es raro en la población brasileña (aproximadamente 0.6%). Se encontró una frecuencia del 1.5% en ambas poblaciones de mexicanos (tepehuanos y mestizos), inferior a la presentada en la población española, la cual es del 8% (Dorado y cols., 2003c; 2011).

En lo que respecta a la variante *CYP2C9\*4*, no ha sido detectada en las poblaciones hispanas estudiadas (Xie y cols., 2002; LLerena y cols., 2004; Dorado y cols., 2011).

La frecuencia del alelo *CYP2C9\*5* en poblaciones hispanas es del 0.5% (Xie y cols., 2002), sin embargo, no se encontró en una población México-americana (LLerena y cols., 2004) ni en españoles, mexicanos tepehuanos y mexicanos mestizos (Dorado y cols., 2011). La observación del alelo *CYP2C9\*5* en brasileños auto-definidos como blancos (Suarez-Kurtz y Sergio, 2007) proporcionan una muestra distinguida de las peculiaridades asociadas con la farmacogenética en poblaciones mezcladas (Suarez-Kurtz y Sergio, 2007). En el caso de los brasileños blancos portadores del alelo *CYP2C9\*5*, la concerniente contribución de europeos, africanos y amerindios a esta piscina genética fueron del 92%, 7.5% y 0.5%, respectivamente (Suarez-Kurtz y Sergio, 2007). Por último, la variante *CYP2C9\*6* no se observó en México-americanos (LLerena y cols., 2004) ni en españoles y mexicanos tepehuanos, pero si se encontró un 0.5% en población mestiza mexicana (Dorado y cols., 2011).

**Tabla VIII.** Frecuencias alélicas (%) del *CYP2C9* en voluntarios sanos de diferentes poblaciones estudiadas.

	Población	N	*1	*2	*3	Referencia
<b>ÁFRICA</b>						
Benín	Indígenas	111	96	0	0	Allabi y cols., 2003
Egipto	Egipcios	247	82	12	6	Hamdy y cols., 2002
Etiopía	Etíopes	150	93	4.3	2.3	Scordo y cols., 2001
Irán	Iraníes	160	79	11	9.7	Peyvandi y cols., 2002
Irán	Iraníes	200	87.2	12.8	0	Zand y cols., 2007
<b>AMÉRICA</b>						
Bolivia	Bolivianos	778	92	4.8	3.0	Bravo-Villalta y cols., 2005
Brasil	Brasileños mezcla	331	84	9	7	Vianna-Jorge y cols., 2004
Brasil	Blancos	136	80	12	8	Vianna-Jorge y cols., 2004
Brasil	Mestizos	118	86	7	7	Vianna-Jorge y cols., 2004
Brasil	Negros	77	93	4	3	Vianna-Jorge y cols., 2004
Canadá	Indios nativos	114	91	3	6	Gaedigk y cols., 2001
Canadá	Inuit	151	100	0	0	Gaedigk y cols., 2001
EE.UU.	Norteamericanos	187	87	7.2	5.9	Kumar y cols., 2008
EE.UU.	Afro-americanos	100	99	1	0.5	Sullivan-Klose y cols., 1996
EE.UU.	Afro-americanos	120	95	2.5	1.3	Dickmann y cols., 2001
EE.UU.	Afro-americanos	110	96.2	0	1.5	Xie y cols., 2002
EE.UU.	Blanco-americanos	100	86	8	6	Sullivan-Klose y cols., 1996
EE.UU.	Blanco-americanos	140	83	13	4.3	Dickmann y cols., 2001
EE.UU.	Blanco-americanos	325	78	15	7	Gaedigk y cols., 2001
EE.UU.	México-americanos	98	86	8	6	LLerena y cols., 2004
México	Mexicanos	100	87	10	3	Aguilar y cols., 2008
México	Mestizos	109	94.5	5.5	0	Machorro-Lazo y cols., 2003
México	Mestizos	102	93	7	1.5	Dorado y cols., 2011
México	Tepehuanos	99	96.5	1	1.5	Dorado y cols., 2011

N= número de individuos



**Tabla VIII (continuación).** Frecuencias alélicas (%) del *CYP2C9* en voluntarios sanos de diferentes poblaciones estudiadas.

	Población	N	*1	*2	*3	Referencia
<b>ASIA</b>						
Canadá	Chinos	102	95	0	4.9	Gaedigk y cols., 2001
China	Chinos	115	98	0	1.7	Wang y cols., 1995
China	Chinos	394	96	0.1	3.6	Yang y cols., 2003
China	Chinos	265	95	0	4.9	Yu y cols., 2004
Corea	Coreanos	574	99	0	1.1	Yoon y cols., 2001
Corea	Coreanos	358	93.4	0	6.0	Bae y cols., 2005
India	Tamilian	135	91	2.6	6.7	Adithan y cols., 2003
Japón	Japoneses	218	98	0	2.1	Nasu y cols., 1997
Japón	Japoneses	140	98	0	1.8	Kimura y cols., 1998
Taiwán	Taiwanesa	82	97	0	2.6	Wang y cols., 1995
Taiwán	Taiwanesa	98	97	0	2.6	Sullivan-Klose y cols., 1996
Turquía	Turcos	499	79	11	10	Aynacioglu y cols., 1999
Turquía	Turcos	64	79	10	11	Yilmaz y cols., 2001
Turquía	Turcos	85	81	10	8.8	Babaoglu y cols., 2004
Vietnam	Vietnamitas	157	98	0	2.2	Kim y cols., 2004
<b>EUROPA</b>						
Alemania	Alemanes	118	81	14	5	Burian y cols., 2002
Alemania	Alemanes	127	86	13.4	0	Xie y cols., 2002
Alemania	Alemanes	367	81.5	10.7	7.8	Xie y cols., 2002
Bélgica	Belgas	121	82	10	7.4	Allabi y cols., 2003
Croacia	Croatas	200	74	17	9.5	Bozina y cols., 2003
Dinamarca	Nórdicos	276	83	12	5.3	Pedersen y cols., 2004
Islas Feroe	Daneses	311	87	8.8	5.3	Halling y cols., 2005
España	Españoles	157	69	14	16	García-Martín y cols., 2001
España	Españoles	102	75	16	9.8	Dorado y cols., 2003c
España	Españoles	327	76	16	8	Dorado y cols., 2011
España	Españoles	200	81.8	12.0	6.0	Mas y cols., 2005
Francia	Franceses	222	96	1.4	2.2	Bodin y cols., 2005
Gran Bretaña	Británicos	100	79	13	8.5	Stubbins y cols., 1996
Inglaterra	Ingleses	100	79	11	11	Aithal y cols., 1999
Italia	Italianos	157	80	11	9.2	Scordo y cols., 2001
Italia	Italianos	360	78	12.5	9.7	Scordo y cols., 2004
Portugal	Portugueses	135	78.8	13.2	8.0	Oliveira y cols., 2007
Rusia	Rusos	290	83	11	6.7	Gaikovitch y cols., 2003
Suecia	Suecos	430	82	11	7.4	Yasar y cols., 1999
Suecia	Suecos	126	67	16.1	17	Sandberg y cols., 2004

N= número de individuos

### 5.3. Relación fenotipo-genotipo *CYP2C9*

Uno de los indicadores más usados para determinar la actividad *CYP2C9 in vitro* ha sido la 4'-hidroxilación de diclofenaco (Yamazaki y cols., 1998; Takanashi y cols., 2000; Ieiri y cols., 2000; Yasar y cols., 2001; Dickmann y cols., 2001). La influencia del genotipo *CYP2C9* en el metabolismo de diclofenaco ha sido estudiada en tres paneles y en una población de voluntarios sanos, evaluándose el índice diclofenaco/4'-OH diclofenaco después de una única toma de 50 mg de este fármaco (Shimamoto y cols., 2000; Yasar y cols., 2001; Morin y cols., 2001; Dorado y cols., 2003c). En 12 voluntarios sanos que expresaban los genotipos *CYP2C9\*1/\*1* y *CYP2C9\*1/\*3*, se observó una ausencia de cambios significativos en el metabolismo de diclofenaco mediado por *CYP2C9* (Shimamoto y cols., 2000). Esta ausencia de relación entre genotipo y farmacocinética de diclofenaco se observó también en otro panel de voluntarios sanos realizado posteriormente (Yasar y cols., 2001), aunque el único voluntario *CYP2C9\*3/\*3* presentaba el IM diclofenaco/4'-OH diclofenaco más alto de todos los participantes. Un estudio similar fue realizado con 18 voluntarios sanos que expresaban los genotipos *CYP2C9\*1/\*1*, *CYP2C9\*1/\*2* y *CYP2C9\*1/\*3* (Morin y cols., 2001). En este trabajo se observó un menor aclaramiento de diclofenaco en los voluntarios portadores del alelo *CYP2C9\*3* en comparación con los *CYP2C9\*1/\*1*, aunque no fue estadísticamente significativo. En este último trabajo, se determinó la existencia de una gran variabilidad en la absorción del fármaco en todos los voluntarios, lo que dificultó la interpretación de los resultados (Morin y cols., 2001). En el estudio de Dorado y cols. (2003c) se determinó que el IM de diclofenaco/4'-OH diclofenaco fue más alto en el grupo de individuos que portaban el alelo *CYP2C9\*3* en heterocigosis en comparación con *CYP2C9\*1/\*1*, y que este índice en individuos con genotipo *CYP2C9\*3/\*3* fue aproximadamente 3 veces mayor que individuos con genotipo *CYP2C9\*1/\*1*. Por tanto, se comprobó que el alelo \*3 influye en el IM de diclofenaco/4'-OH diclofenaco. Aun así, no se pudo diferenciar individuos con fenotipo PM debido a un gran solapamiento en los IM.

El efecto del genotipo *CYP2C9* en la farmacocinética de **losartán** *in vivo* no ha sido bien descrito hasta la fecha en poblaciones grandes. Sin embargo, existen evidencias en microsomas de hígado humano genotipados para el *CYP2C9* que sugieren que este polimorfismo podría alterar significativamente la formación de E-3174 (Yasar y cols., 2001).

El efecto del genotipo *CYP2C9* sobre el metabolismo de losartán ha sido puesto de manifiesto en un caso clínico. Un individuo con el genotipo *CYP2C9*\*3/\*3 convirtió menos del 1% de la dosis administrada de losartán a E-3174 (McCrea y cols., 1999).

#### 5.4. Implicaciones clínicas del polimorfismo *CYP2C9*

El polimorfismo genético y la presencia de las diferentes variantes alélicas del *CYP2C9* pueden influir en el descenso de actividad metabólica de esta enzima. En un estudio con pacientes en tratamiento con tolbutamida, aquellos que presentaban los genotipos *CYP2C9*\*3/\*3 y *CYP2C9*\*2/\*3 mostraron un incremento en la vida media y una reducción en el aclaramiento del fármaco en comparación con un grupo de pacientes control (Sullivan-Klose y cols., 1996). En estudios con pacientes epilépticos en tratamiento con fenitoína (van der Weide y cols., 2001; Caraco y cols., 2001) se observó que los portadores de al menos una variante alélica del *CYP2C9* (*CYP2C9*\*2 o *CYP2C9*\*3), requerían unas dosis de fenitoína significativamente más bajas que la de los individuos *CYP2C9*\*1/\*1. También en un grupo de 134 pacientes en tratamiento con fenitoína se observó una reducción significativa en el índice de concentraciones plasmáticas pHPH/fenitoína en pacientes con genotipo *CYP2C9*\*1/\*3, en relación con los que presentaban un genotipo *CYP2C9*\*1/\*1 (Mamiya y cols., 1998). Por otro lado, ha sido reportado que individuos portadores de los alelos *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3 tuvieron una reducción en el aclaramiento y en las concentraciones plasmáticas de warfarina (Furuya y cols., 1995; Takahashi y cols., 1998; Aithal y cols., 1999; Margaglione y cols., 2000).

Por otro lado, se han identificado casos de intoxicación por **fenitoína** relacionados con el polimorfismo del *CYP2C9*. Un paciente con genotipo *CYP2C9*\*1/\*3 (Ninomiya y cols., 2000) y otro con el genotipo *CYP2C9*\*1/\*4 (Ieiri y cols., 2000) mostraron alteraciones significativas en la farmacocinética de fenitoína, así como también efectos adversos inducidos por este fármaco. Se ha publicado el caso de una sobredosis por fenitoína en un paciente que expresaba el genotipo *CYP2C9*\*3/\*3 (Brandolese y cols., 2001). Recientemente, se ha reportado otro caso de intoxicación por fenitoína en un paciente epiléptico en edad pediátrica con genotipo *CYP2C9*\*2/\*2 (Dorado y cols., 2012a). Los niveles plasmáticos de este fármaco se encontraban por encima de los normales, lo que podría deberse a que este

paciente era homocigoto para la variante \*2 del gen *CYP2C9* y heterocigoto para la variante \*4 del gen *CYP2C19*. Este hecho, podría explicar también que la vida media de este fármaco fuese más del doble que los normales para este tipo de pacientes.

También, el caso de una intoxicación severa por este fármaco en un individuo afroamericano homocigoto para el alelo "nulo" *CYP2C9\*6 (del818A)*, por lo que se propuso a partir de este hecho que aquellos individuos homocigotos para el alelo *CYP2C9\*6* tendrán una ausencia total de la actividad *CYP2C9* (Kidd y cols., 2001).

Los pacientes en tratamiento con **warfarina** y que expresaban los alelos *CYP2C9\*2* y/o *CYP2C9\*3*, tuvieron más hemorragias y una hospitalización más prolongada que aquellos que presentaban el genotipo *CYP2C9\*1/\*1* (Aithal y cols., 1999; Margaglione y cols., 2000; Taube y cols., 2000). También se ha descrito el caso de una paciente con genotipo *CYP2C9\*2/\*3*, en tratamiento con warfarina, que presentó una hemorragia gastrointestinal (Bloch y cols., 2002).

Se ha mostrado el caso de una potenciación de la anticoagulación por **acenocumarol** en dos pacientes homocigotos para el alelo *CYP2C9\*3*, los cuales se encontraban en tratamiento con la dosis diaria recomendada de este fármaco (Verstuyft y cols., 2001).

Otro de los factores que pueden influir en la aparición de efectos adversos es la administración concomitante de fármacos metabolizados por el *CYP2C9*, a partir de una potencial interacción metabólica. Una paciente en tratamiento con **clopidogrel** y **celecoxib**, presentó una hemorragia intracraneal que no había sido detectada anteriormente (Fisher y Le Couteur, 2001). Los autores de este estudio clínico han sugerido que la hemorragia pudo ser debida a una interacción farmacocinética mediada por el citocromo *CYP2C9* (Fisher y Le Couteur, 2001).

También se ha descrito el caso de un paciente en tratamiento con **fluorouracilo** y **fenitoína** que presentó efectos adversos, estos desaparecieron al reducir la dosis de fenitoína. La causa más probable de esto pudo ser la inhibición del *CYP2C9* (Gilbar y Brodribb, 2001). También han sido reportados otros casos de intoxicaciones debidas a la interacción de fármacos metabolizados por el *CYP2C9*, como **fenitoína** y **tolbutamida** (Wesseling y Mols-Thurkow, 1975; Beech y cols., 1988). En un estudio en el que se evaluó la posible interacción

entre **losartán** y **fenitoína** en 16 voluntarios sanos (Fischer y cols., 2002), se concluyó que losartán no tenía efecto sobre la farmacocinética de fenitoína, pero que fenitoína sí inhibía la conversión de losartán a E-3174 mediada por el CYP2C9. Recientemente ha sido descrito el mayor riesgo de padecer hemorragias gastrointestinales por uso concomitante de **fluoxetina** y **AINEs**, fármacos en cuyos metabolismos participa el CYP2C9 (Oksbjerg y cols., 2003).

En otro estudio donde se evaluó la potencial influencia de los genotipos *CYP2D6* y *CYP2C9* sobre las concentraciones de fluoxetina en pacientes en tratamiento con este fármaco se pudo observar que las concentraciones plasmáticas de fluoxetina fueron significativamente más altas en los grupos de pacientes con los genotipos *CYP2C9\*1/\*2* y *CYP2C9\*1/\*3* en comparación con los *CYP2C9\*1/\*1* (LLerena y cols., 2004).

En un estudio *in vitro*, la actividad de la enzima CYP2C9 fue inhibida por etanol (Tatsumi y cols., 2009), y otro reciente estudio *in vitro* se ha reportado la influencia del 17 $\alpha$ -etinilestradiol en la inhibición de la expresión de CYP2C9 (Mwinyi y cols., 2011), lo cual podría estar relacionado con una posible diferencia de la actividad de esta enzima entre géneros.

Recientemente, en una población sueca se ha encontrado un paciente que padeció toxicidad por fenitoína y que se encontraba en tratamiento concomitante con fluconazol (que es un inhibidor de CYP2C9). Este individuo estaba en tratamiento con altas dosis de fenitoína (Helldén y cols., 2010). Los responsables de este estudio propusieron que esas altas dosis en el tratamiento con fenitoína eran debidas a una alta actividad de la enzima CYP2C9. Por eso, a este paciente se le realizó un test de fenotipación con losartán (Christensen y cols., 2003) lo que dio como resultado un bajo IM, lo que implica que existe una alta actividad de la enzima CYP2C9 (Helldén y cols., 2010). Se ha intentado relacionar la alta actividad de la enzima CYP2C9 con determinados SNPs (IVS8-109 A>T), pero esto aún permanece sin aclarar (Hatta y cols., 2012).

En resumen, aquellos individuos con el alelo *CYP2C9\*3* (principalmente los pacientes homocigotos para el *CYP2C9\*3*) que se encuentren en tratamiento concomitante con fármacos metabolizados por el CYP2C9, o con inhibidores de la actividad de esta enzima, parecen estar en mayor riesgo de experimentar la aparición de efectos adversos potencialmente peligrosos.

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

	Página
1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS.....	42
2. OBJETIVO GENERAL.....	49
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49

---

## 1. JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS ESTUDIOS

España, debido a su situación geográfica, es la frontera con Europa para los extranjeros procedentes de África; por otro lado, debido a vínculos históricos y culturales con países iberoamericanos da lugar a que sea uno de los destinos prioritarios para los extranjeros de habla hispana. Por ejemplo, en el año 2003 casi el 40% de los extranjeros residentes en España proceden de América Central y América del Sur; además, la población extranjera más numerosa en nuestro país es la ecuatoriana que representa el 14.6% de la población extranjera total (Instituto Nacional de Estadística, 2003). Esta población recibe tratamientos con las mismas pautas que se utilizan en la población española en su mayoría blancos europeos o caucásicos.

Se ha comprobado que existe variabilidad interétnica en el metabolismo de fármacos, por tanto al administrar las mismas dosis de un fármaco a personas pertenecientes a diferentes etnias podrían tener una respuesta diferente. Por tanto, el estudio de la variabilidad poblacional de las enzimas metabolizadoras de fármacos CYP2D6 y CYP2C9 puede servir para determinar en qué manera las dosis recomendadas se podrían ajustar a una determinada población. Hasta la fecha no existe ningún estudio de este tipo realizado en población ecuatoriana.

Este trabajo de Tesis ha sido dividido en dos estudios:

**Estudio I.** Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

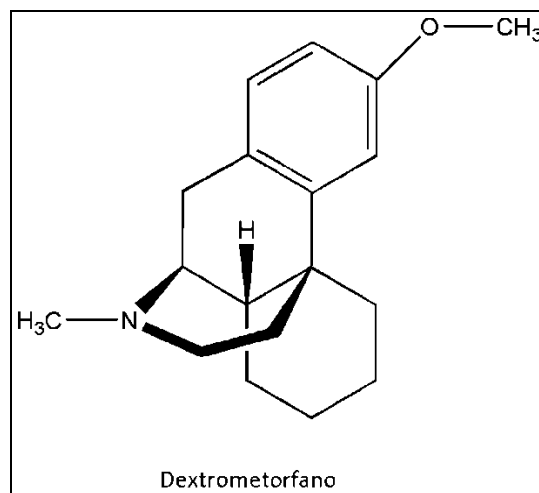
**Estudio II.** Fenotipo metabólico de losartán y genotipos *CYP2C9* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

## 1.1. ESTUDIO I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano, genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

### 1.1.1. Estudio I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.

Se han realizado numerosos estudios de genotipación para evaluar la capacidad de la actividad de la enzima CYP2D6, pero esta aproximación no debe ser tomada como real. La capacidad metabólica de la enzima sólo puede ser analizada mediante estudios de fenotipación a través de algunos fármacos usados como fármacos test como son: debrisoquina, metoprolol, tramadol, esparteína, debrisoquina o dextrometorfano (Figura 5). Actualmente se prefiere utilizar dextrometorfano al resto de fármacos ya que es más seguro.

Figura 5. Fórmula estructural del dextrometorfano.

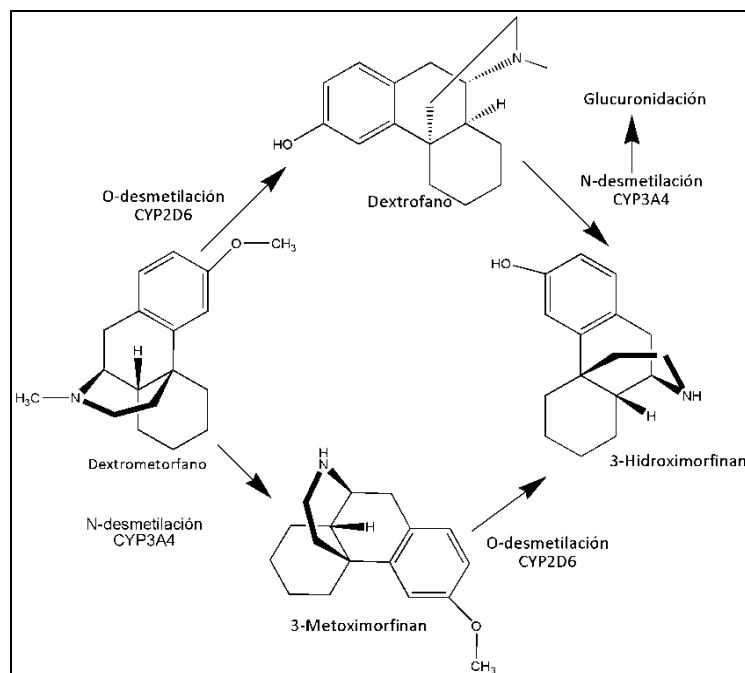


El dextrometorfano es un análogo de la codeína (Yu y Haining, 2001), fármaco de uso común que en dosis terapéuticas actúa sobre el sistema nervioso central para inhibir la tos. El dextrometorfano es rápidamente absorbido por el conducto gastrointestinal y comienza su metabolización de los 15 a los 60 minutos después de la ingestión.



El dextrometorfano tiene dos vías de metabolización principales, por un lado sufre una *O*-desmetilación y se transforma en dextrofanano (Afshar y cols., 2004), su principal metabolito, paso catalizado por la enzima citocromo P450, en concreto CYP2D6 (Figura 6). Por otro lado, el dextrometorfano sufre una *N*-desmetilación por el citocromo P4503A4 (CYP3A4) y se genera uno de sus metabolitos secundarios, el 3-metoximorfinano. En una segunda vía de metabolización se puede obtener 3-hidroximorfinano a partir de dextrofanano, ya que el CYP3A4 *N*-desmetila a este, o también a partir del 3-metoximorfinano que sufre una *O*-desmetilación por el CYP2D6 (Figura 6).

**Figura 6.** Esquema de las vías de metabolización de dextrometorfano (basada en Yu y Haining, 2001).



Para la determinación de dextrometorfano y dextrofanano en plasma existen publicados diversos métodos que usan HPLC con espectrometría de masas (MS) (Eichhold y cols., 2007; Kuhlenbeck y cols., 2005; Mc Cauley-Myersy cols., 2000), otros métodos que utilizan cromatografía líquida de alta resolución con detección en fluorescencia (Afshar y cols., 2004; Kumar y cols., 2007; Härtter y cols., 1996). Dos de ellos están validados en animales (Kumar y cols., 2007; McCauley-Myersy cols., 2000). Uno de los métodos de cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (Härtter y cols., 1996) además de analizar

dextrometorfano y dextrorfano también determina 3-hidroximorfinan y 3-metoximorfinan. Otro de ellos (Afshar y cols., 2004) no analiza 3-metoximorfinan, pero sí el resto de analitos, mientras otro de los estudios (Kumar y cols., 2007) únicamente determina dextrometorfano y dextrorfano, además combina HPLC con espectrometría de masas con detección ultravioleta en plasma de cerdo. Por tanto sería necesario el desarrollo y validación de un nuevo método analítico de HPLC con detección ultravioleta para la determinación de dextrometorfano y dextrorfano.

### ***1.1.2. Estudio I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.***

La enzima CYP2D6 es responsable del metabolismo del 25% de todos los fármacos actualmente disponibles en el mercado (Eichelbaum y cols., 2006). Además puede presentar variantes alélicas que codifican enzimas que pueden tener actividad ausente, aumentada o disminuida. Como se ha visto anteriormente, estas variantes alélicas se presentan en diferentes proporciones entre las diferentes poblaciones y etnias.

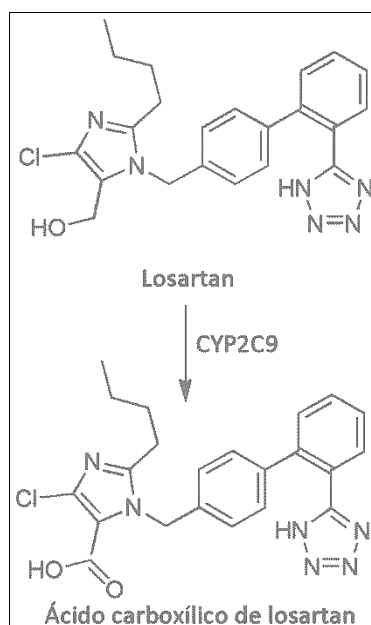
Podría ser de gran interés conocer las frecuencias de variantes alélicas de *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Ecuador que tengan una relevancia clínica. Se ha explicado anteriormente que los factores genéticos y ambientales son determinantes en el metabolismo oxidativo de fármacos. Estos factores pueden alterar el fenotipo, haciendo necesario realizar modificaciones en el régimen de dosis para mejorar la eficacia terapéutica. Diversos factores ambientales como la dieta, agentes químicos, hidrocarburos policíclicos, tabaco, alcohol o disolventes orgánicos podrían alterar la actividad enzimática (Vesell, 1979; 1984; Eichelbaum, 1985; Schellens y Breimer, 1987; Jordan y Wolf, 1987). No existen estudios de fenotipación en la población ecuatoriana, de ahí la importancia de realizar el estudio de todos los factores.

## 1.2. ESTUDIO II. Fenotipo metabólico de losartán, genotipos *CYP2C9* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

### 1.2.1. Estudio II.1. Desarrollo y validación de un método de HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del *CYP2C9*.

La enzima *CYP2C9* tiene un papel importante en el metabolismo de fármacos de importancia terapéutica como son warfarina, fenitoína, tolbutamida, glizipida, losartán (Figura 7) y la mayor parte de los AINES (Miners y Birkett, 1998; Yasar y cols., 2002a; Dorado y cols., 2003c; Llerena y cols., 2004). Hay muy pocos estudios que determinen el fenotipo metabólico en poblaciones para ser utilizado como una medida de la actividad metabólica de la enzima *CYP2C9*.

**Figura7.** Principal vía de metabolización de losartán.



Se han desarrollado diferentes métodos de separación y detección de losartán y E-3174 en orina y plasma empleando electroforesis capilar (Zhang y cols., 2006), HPLC-Ultravioleta (Furtek y Lo, 1992; Yeung y cols., 2000), HPLC-Fluorescencia (del Rosario Brunetto y cols., 2009; Farthing y cols., 1997; Ritter y cols., 1997) y HPLC-MS (Polinko y cols., 2003; Shah y cols., 2009). Aunque la técnica de HPLC con detección por MS obtiene una separación más

eficiente, esta es utilizada en menor medida en laboratorios de rutina que otros sistemas de detección, ya que son más económicos y tienen una menor complejidad de trabajo y mantenimiento. Por esta razón, el detector de fluorescencia es una buena alternativa ya que consigue alcanzar una sensibilidad y selectividad aceptable frente a otros tipos de detectores utilizados frecuentemente. Por otra parte, la preparación de la muestra es un paso importante a la hora de obtener una buena separación y detección de los analitos. Existen diferentes sistemas de extracción que se aplican a las matrices biológicas en las que se encuentran presentes nuestros analitos de interés (losartán y E-3174) como son la extracción líquido-líquido (Ritter y cols., 1997), extracción en fase sólida (SPE) (Kolocouri y cols., 2007) y microextracción en fase sólida (Zhang y cols., 2006).

Por todo esto es necesario desarrollar un nuevo método que sea preciso, reproducible y sensible que consiga ser sencillo y rápido para la determinación de losartán y E-3174 y así poder ser utilizado en estudios farmacogenéticos en muestras de orina humana.

### ***1.2.2. Estudio II.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.***

La enzima CYP2C9 metaboliza fármacos terapéuticamente importantes incluidos diversos antihipertensivos, antidiabéticos, fármacos AINEs de amplia prescripción a nivel mundial y con una ventana terapéutica estrecha como por ejemplo warfarina y fenitoína (Shimada y cols., 1994; Goldstein y De Morais, 1994). Por lo tanto, la variabilidad interindividual de CYP2C9 puede producir una toxicidad farmacológica en tratamiento con warfarina o fenitoína (Miners y Birkett, 1998; Ninoyima y cols., 2000; Kidd y cols., 2001), en fallo terapéutico (Schwarz, 2003) o la aparición de reacciones adversas cuando el individuo está en tratamiento concomitante (Gilbar y Brodribb, 2001).

Como hemos revisado anteriormente, algunas variantes genéticas de *CYP2C9* codifican para proteínas con actividad disminuida (*CYP2C9\*2*, *\*3*, *\*4*, *\*5*) o sin actividad (*CYP2C9\*6*). Hasta la fecha se han realizado algunos estudios que reportan frecuencias alélicas del *CYP2C9* en diferentes poblaciones hispanas, pero ninguno ha evaluado la población ecuatoriana.

Tampoco hay suficientes estudios que evalúen la actividad de la enzima CYP2C9 *in vivo* y su relación con el genotipo.

Por tanto, existe una necesidad de realizar más estudios farmacogenéticos del CYP2C9 encaminados a la optimización de los tratamientos con fármacos que sean sustratos de esta enzima en diferentes poblaciones.

## 2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de los trabajos de la presente Tesis fue describir en una población ecuatoriana los fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, los polimorfismos genéticos de *CYP2D6* y *CYP2C9* asociados y la relación entre ellos; adicionalmente estudiar diferencias con una población española.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 3.1. ESTUDIO I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

I.1 Desarrollar un nuevo método HPLC para cuantificar dextrometorfano y su metabolito dextrorfano en plasma humano.

I.2. Evaluar la variabilidad interindividual en el metabolismo de dextrometorfano en una población ecuatoriana y compararla con una población española.

I.3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *CYP2D6* en una población ecuatoriana y compararlas con una población española.

I.4. Evaluar la influencia de factores ambientales y del genotipo *CYP2D6* sobre el fenotipo metabólico de dextrometorfano en la población ecuatoriana.

**3.2. ESTUDIO II. Fenotipo metabólico de losartán y genotipos *CYP2C9* en una población ecuatoriana respecto de la española.**

II.1. Desarrollar un método HPLC para la cuantificación de losartán y E-3174 en orina humana.

II.2. Evaluar la variabilidad interindividual del metabolismo de losartán en una población ecuatoriana y compararla con una población española.

II.3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *CYP2C9* en una población ecuatoriana y compararlas con una población española.

II.4. Evaluar la influencia de factores ambientales y del genotipo *CYP2C9* sobre el fenotipo metabólico de losartán en la población ecuatoriana.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---

	Página
<b>1. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	52
<b>2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN</b> .....	55
<b>3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS</b> .....	58
3.1. Análisis genéticos.....	58
3.2. Análisis cromatográficos.....	59
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	62
4.1. Análisis de los genotipos <i>CYP2D6</i> .....	62
4.2. Análisis de los genotipos <i>CYP2C9</i> .....	66
4.3. Análisis cromatográficos.....	66
<b>5. CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	73
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	74

---



## 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los Estudios incluidos en la presente Tesis han sido realizados en muestras procedentes de voluntarios sanos (Tabla IX). Estos voluntarios fueron en su mayoría estudiantes de la Universidad Central del Ecuador en Quito, los cuales fueron clasificados como mestizos. Por otra parte, el panel de voluntarios sanos incluido en el Estudio II corresponde a un grupo de individuos residentes en Extremadura, así como los controles utilizados para comparar en la población española.

En el Estudio I se compararán los resultados con la población española fenotipada con dextrometorfano (Henthorn y cols., 1989) y en el Estudio II se comparará con otra población española fenotipada con diclofenaco (Dorado y cols., 2003c) y con el panel de voluntarios sanos españoles.

**Tabla IX.** Descripción general de las poblaciones de estudio de la presente Tesis.

Estudio	Población	N	Determinación	Técnica
I	Voluntarios sanos	118	Variantes alélicas de <i>CYP2D6</i>	RT-PCR; XL-PCR
			Dextrometorfano y su metabolito en plasma	HPLC-UV
II.1	Voluntarios sanos	13	Losartán y su metabolito en orina	HPLC-FLU
II.2	Voluntarios sanos	194	Variantes alélicas de <i>CYP2C9</i>	RT-PCR; PCR-RFLP
			Losartán y su metabolito en orina	HPLC-FLU

**N**= número de individuos; **RT-PCR**= reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real; **XL-PCR**= extra-long PCR; **HPLC-UV**= cromatografía líquida de alta resolución con detección por ultravioleta; **HPLC-FLU**= HPLC con detección por fluorescencia; **PCR-RFLP**= PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

Las concentraciones plasmáticas de dextrometorfano, así como las concentraciones urinarias de losartán y sus metabolitos, fueron determinadas mediante el desarrollo de dos nuevos métodos de HPLC con detección por ultravioleta y fluorescencia, respectivamente. La determinación de las frecuencias alélicas de *CYP2D6* y *CYP2C9* se han realizado por técnicas de RT-PCR a través de sondas prediseñadas, técnicas de XL-PCR y PCR-RFLP desarrolladas en nuestros laboratorios del Centro de Investigación Clínica del Área de Salud de Badajoz (CICAB) (Dorado y cols., 2003c; Dorado y cols., 2005).

A todos los participantes en los estudios de la presente Tesis, se les realizó un examen físico rutinario. Este incluía exploración física, medición del peso, de la talla y de la presión arterial. También se recogieron los antecedentes tanto personales como familiares de enfermedades, alergias, etc. Todos estos datos, más la fecha y lugar de nacimiento, edad, sexo, hábitos de consumo (consumo de tabaco, alcohol, cafeína) y los datos propios de la prueba (volumen de orina, horas de recolección) fueron recogidos en un protocolo confeccionado para tal fin.

### **1.1. ESTUDIO I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.**

#### ***1.1.1. Estudio I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.***

En este estudio se realizó en una población compuesta por 118 voluntarios sanos (58% de mujeres). Presentaron una media de edad ( $\pm$ , desviación estándar, DS) de  $25 \pm 8.5$  años. La mayoría de los voluntarios fueron estudiantes de la Universidad Central de Ecuador en Quito, pero procedían de varias regiones de Ecuador: un 59% ( $n=70$ ) residían en Quito (2800 msnm), un 19% ( $n=22$ ) en Cuenca (970 km al Sur de Quito), y un 5% ( $n=6$ ) en Tulcán (430 km al Norte de Quito), todos localizados en la región Andina. Además un 17% ( $n=20$ ) residían en Guayaquil (22 msnm), en la Costa del Pacífico. En cualquier caso, en términos de etnicidad todos los sujetos fueron clasificados como mestizos, es decir, una mezcla de españoles con poblaciones andinas.

**1.2. Estudio II. Fenotipo metabólico de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.**

***1.2.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán y su metabolito en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.***

En este estudio participaron 13 voluntarios sanos (8 mujeres y 5 hombres) con una edad comprendida entre 21 a 53 años y con un peso de 45 a 90 kg. Este panel de voluntarios sanos estaba formado por población española residente en la provincia de Badajoz.

***1.2.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.***

Para la determinación de los fenotipos metabólicos de losartán y genotipos CYP2C9 participó una población compuesta por 194 voluntarios sanos (58% de mujeres), con una media de edad ( $\pm$ DS) de  $21.5 \pm 3.7$  años, la mayoría de los cuales eran estudiantes de la Universidad Central de Ecuador en Quito. Sin embargo, su lugar de procedencia fueron diferentes regiones de Ecuador. Todos ellos fueron clasificados como mestizos (mezcla de españoles con poblaciones andinas).

## 2. PROTOCOLO GENERAL DE INVESTIGACIÓN

### 2.1. Examen clínico

A los voluntarios que participaron en los estudios se les realizó una historia clínica y farmacológica, recogiendo los antecedentes patológicos personales y familiares. Además del examen clínico de rutina, se realizaron pruebas bioquímicas, de función hepática y renal. Además, se registraron hábitos de consumo (alcohol, tabaco y drogas de abuso), uso de plantas medicinales y de fármacos.

### 2.2. Criterios de inclusión y exclusión

#### *Criterios de inclusión:*

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

#### *Criterios de exclusión:*

- a) Historias clínicas con datos incompletos.
- b) Individuos bajo tratamiento farmacológico. Personas que solicitaran revocar el consentimiento informado y/o que por algún motivo hayan tomado medicamentos, alcohol o algún alimento horas antes del estudio farmacocinético.

### 2.3. Protocolos de Estudio

Los protocolos de Estudio que se realizaron en los Estudios I y II, los cuales se detallan a continuación.

#### **2.3.1. Protocolo de Estudio I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos CYP2D6 en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española**

La extracción de sangre fue realizada a las 3 horas de haber tomado una dosis única de 30 mg de dextrometorfano (Laboratorios HG, Guayaquil, Ecuador), el plasma fue separado de la parte celular, se almacenó a -20 °C y se transportaron desde Quito (Ecuador) hasta Badajoz (España). El análisis de dextrometorfano y su principal metabolito dextrorfano fue evaluado con el nuevo método HPLC desarrollado en nuestro laboratorio y que se analiza en la presente Tesis.

Para evaluar la influencia de los genotipos CYP2D6, la población de estudio fue genotipada para los alelos CYP2D6\*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35, \*41 y las multiplicaciones del gen, tras el aislamiento de ADN a partir de muestras de sangre.

#### **2.3.2. Protocolo de Estudio II. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto a la española**

##### 2.3.2.1. Estudio II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.

A los voluntarios que participaron en este estudio se les administró 25 mg de losartán (Cozaar, Merck Sharp & Dohme, EE.UU.) después de 2-3 horas de ayuno. Se recogió la orina tras 8 horas de sueño y fue almacenada a -20 °C. Cada voluntario fue genotipado para los alelos CYP2C9\*1, \*2 y \*3 antes de su inclusión en el estudio, los genotipos fueron CYP2C9\*1/\*1 (n=7), CYP2C9\*1/\*2 (n=2), CYP2C9\*1/\*3 (n=2) y CYP2C9\*3/\*3 (n=2) (Yasar y

cols., 2002a). Este panel de voluntarios sanos fue previamente analizado con otro método diferente de HPLC (Yasar y cols., 2002a).

#### 2.3.2.2. Estudio II.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.

Para la realización de este estudio las muestras de la población estudiada se obtuvieron después de la toma de una dosis única de 25 mg de losartán (Santa Cruz, CA, USA), se midió la orina recogida y se almacenaron dos muestras de 20 mL a -20 °C. El IM de losartán/E-3174 se analizó con el método desarrollado en nuestro laboratorio y que forma parte de la presente Tesis (Estudio II.1).

Para evaluar la influencia de los genotipos *CYP2C9*, la población de estudio fue genotipada tras el aislamiento de ADN a partir de muestras de sangre para los alelos *CYP2C9*\*2, \*3, \*4, \*5 y \*6.

### 3. INSTRUMENTOS, APARATOS Y REACTIVOS

#### 3.1. Análisis genéticos

##### 3.1.1. Análisis de los genotipos *CYP2D6*

Para la determinación de los genotipos *CYP2D6* se utilizaron muestras de sangre recogidas en tubos con EDTA potásico (Vacutainer®, BD, EE.UU.), previamente codificadas y almacenadas a -20 °C hasta el momento de su utilización, para el aislamiento del ADN genómico, se utilizó el kit QIAamp®DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

En el estudio del análisis de las diferentes variantes alélicas del gen *CYP2D6* se utilizó una metodología previamente desarrollada en el laboratorio (Dorado y cols., 2005) que está basada en técnicas de Real Time PCR (RT-PCR) a través de sondas TaqMan y extra long PCR (XL-PCR). Las reacciones de RT-PCR para las variantes alélicas estudiadas a excepción de las duplicaciones y alelo *CYP2D6\*5* se efectuaron en un Fast 7300 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las reacciones de XL-PCR para las duplicaciones y el alelo *CYP2D6\*5* se realizaron en un termociclador de marca Mastercycler 384 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Se utilizó la mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Germany), los dinucleótidos trifosfato (dNTPs) fueron Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y los oligonucleótidos fueron adquiridos a Stab Vida (Lisboa, Portugal). La agarosa utilizada para la obtención de los geles fue de Panreac (Barcelona, España). La visualización de los geles se llevó a cabo a través de una tinción con bromuro de etidio 10 µg/mL (Sigma S.A., Madrid, España) y un transiluminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

##### 3.1.2. Análisis de los genotipos *CYP2C9*

Para la determinación de los genotipos *CYP2C9* se utilizaron muestras de sangre recogidos en tubos con EDTA potásico (Vacutainer®, BD, EE.UU.), previamente codificadas y almacenadas a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para el aislamiento del ADN

genómico a partir de las muestras de sangres recogidas, se utilizó el kit Centrapuregen kit (Indianapolis, IN, USA). Para el estudio de las variantes alélicas del *CYP2C9*\*2, \*3 y \*6 se utilizó la metodología basada en la técnica de RT-PCR a través de sondas TaqMan. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un Fast 7300 Real-Time Sistema (Applied Biosystems, Forster City, CA, EE.UU.). Los alelos *CYP2C9*\*4 y \*5 se analizaron mediante reacciones de PCR. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de marca Mastercycler 384 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Los dNTPs fueron Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y los oligonucleótidos fueron adquiridos a StaB Vida (Lisboa, Portugal). La agarosa utilizada para la obtención de los geles fue de Panreac (Barcelona, España). La visualización de los geles se llevó a cabo a través de una tinción con bromuro de etidio 10 µg/mL (Sigma S.A., Madrid, España) y un transiluminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

### **3.2. Análisis cromatográficos**

#### **3.2.1. Reactivos**

Los patrones de dextrometorfano y dextrorfano fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España) para el Estudio I.1. Dextrometorfano para el Estudio II.1 fue suministrado por Laboratorios HG (Guayaquil, Ecuador). Losartán y su metabolito (EXP-3174) fueron distribuidos por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (Estudio II) y el losartán (Cozaar®) para el Estudio II.2. fue proporcionado por Merck Sharp & Dohme (Darmstadt, Alemania). El acetonitrilo de calidad HPLC, metanol, hexano, dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), diisopropil éter y ácido ortofosfórico fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El agua fue purificada usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). El ácido hidrocloclorhídrico, hidróxido de sodio y metil tert butil éter (MTBE) UV-IR-HPLC fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España).



### 3.2.2. Soluciones patrón

Las soluciones almacén de dextrometorfano y dextrorfano se prepararon a una concentración de 100 µg/mL, mientras que el estándar interno (EI) levallorfan se preparó a una concentración de 5000 µg/mL. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución de las soluciones de almacén a 1 y 10 µg/mL para dextrometorfano y dextrorfano, mientras que para el EI se preparó a una concentración de 20 µg/mL. Todas las soluciones fueron preparadas en metanol, guardadas bajo refrigeración a 4 °C y protegidas de la luz.

Las soluciones almacén de losartán y E-3174 se prepararon en metanol a una concentración de 100 µg/mL y fueron almacenadas en oscuridad a -20 °C hasta su uso posterior. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución de soluciones de almacén a 1 y 10 µg/mL para ambos analitos en metanol y guardadas bajo refrigeración y protegidas de la luz.

### 3.2.3. Instrumentos

Las concentraciones plasmáticas de dextrometorfano y dextrorfano para el **Estudio I** fueron determinadas mediante HPLC con detección por ultravioleta. El sistema de cromatografía líquida utilizado (Beckman Instruments, Fullerton, CA) estaba compuesto por una bomba de solvente modelo System Gold 118 y un detector modular programable modelo 166, un inyector Rheodyne modelo 7725i con un “loop” de 20 µL. Acoplado a este sistema se situó un ordenador compatible con el software Beckman 32 Karat ver. 7.0. La columna cromatográfica en fase inversa fue ACE 5 phenyl (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland).

Las concentraciones plasmáticas de losartán y E-3174 para el **Estudio II** fueron determinadas mediante HPLC con detección por fluorescencia. El sistema de cromatografía líquida utilizado (Beckman Instruments, Fullerton, CA) estaba compuesto por una bomba de solvente modelo System Gold 118 y un sistema modular de detección por fluorescencia modelo FP-2020 de Jasco (Tokyo, Japan) y un inyector Rheodyne modelo 7725i con un loop de 50 µL. Acoplados a este sistema había un PC compatible con el software Beckman 32

Karat ver. 7.0. La columna analítica en fase reversa fue ACE 5 phenyl (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Análisis de los genotipos *CYP2D6*

#### 4.1.1. Detección de las duplicaciones

Para determinar si los individuos presentaban duplicaciones del gen *CYP2D6* se empleó una PCR-XL. Los primers que se utilizaron para ello fueron 2D6dupl-F y 2D6dupl-R (Lundqvist y cols., 1999), generan un fragmento de 3.5 kb, que determina la presencia de duplicaciones en el gen (Tabla XI). Además, en la misma PCR, se amplifica el gen *CYP2D6* completo de 5.1 kb (Tabla XI) utilizando el primer forward DPKup y el reverso DPKlow (Hersberger y cols., 2000). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, se utilizaron 0.375 µL de la mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template). La amplificación de 50 a 100 ng/µL de ADN genómico humano se realizó con 2.5 µL de PCR buffer 3 que se proporciona con la enzima (2.75 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 mM de cada dNTPs y 0.4 µM de cada primer (Tabla X).

Las condiciones fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, seguidos de 10 ciclos de 20 segundos a 95 °C y 4 minutos a 68 °C, 20 ciclos más aumentando 5 segundos cada paso de 68 °C, y una extensión final de 7 minutos a 68 °C. El producto de la PCR se analizó directamente en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y el ADN se visualizó con bromuro de etidio. Esta reacción de PCR-XL dio lugar a fragmentos de 5.1 kb, los cuales se utilizan para posteriores diagnósticos por PCR-RFLP y como banda control, y de 3.5 kb solo si existen alelos con duplicaciones (Tabla XI).

#### 4.1.2. Detección del alelo *CYP2D6\*5*

Para determinar si los individuos presentan la variante *CYP2D6\*5*, se llevó a cabo una PCR-XL. Los primers fueron 5'2D6\*5 y 3'2D6\*5 (Steen y cols., 1995), que son específicos para determinar la presencia del alelo *CYP2D6\*5* (3.5 kb) (Tabla XI). Además, en la misma PCR, se amplifica el gen *CYP2D6* entero (5.1 kb) utilizando el primer forward DPKup y el reverso

DPKlow (Hersberger y cols., 2000). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , se utilizaron 0.375  $\mu\text{L}$  de la mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerase (Expand Long Template). La amplificación de 50 a 100 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN genómico humano se realizó con 2.5  $\mu\text{L}$  de PCR buffer 3 que se proporciona con la enzima (2.75 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0.5 mM de cada dNTPs y 0.4  $\mu\text{M}$  de cada primer (Tabla X).

**Tabla X.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCRs para determinación de las variantes alélicas del *CYP2D6* (Dorado y cols., 2005).

Primer	Secuencias 5' - 3'
DPKup	GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTCA
DPKlow	GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA
2D6dupl-F	CCTGGGAAGGCCCATGGAAG
2D6dupl-R	CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT
5'2D6dup	GCCACCATGGTGTCTTTGCTTTCCTGG
3'2D6dup	GGTTTCTTGGCCGCTGTCCCACTC
5'2D6*5	CACCAGGCACCTGTACTCCTC
3'2D6*5	CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC
3'2D6*1xN	CCTGTCTCAAATGCGGCCAGGCGGTGGGGTA

N= número de copias

Las condiciones fueron las mismas que para la detección de las multiplicaciones: 2 minutos a 94 °C, seguidos de 10 ciclos de 20 segundos a 95 °C y 4 minutos a 68 °C, 20 ciclos más aumentando 5 segundos cada paso de 68 °C, y una extensión final de 7 minutos a 68 °C. El producto de la PCR se analizó directamente en una electroforesis mediante un gel de agarosa al 0.8% y el ADN se visualizó con bromuro de etidio. Esta reacción de PCR-XL dio lugar a fragmentos de 5.1 kb, los cuales se utilizan para posteriores diagnósticos por PCR-RFLP y como un control que indique que la PCR ha sido favorable, y de 3.5 kb solo si existe la variante *CYP2D6\*5* (Tabla XI).

#### **4.1.3. Detección de las multiplicaciones de los alelos *CYP2D6\*1*, \*2 o \*4**

Todas las muestras de ADN que poseían duplicaciones se analizaron para los alelos *CYP2D6\*1xN*, \*2xN y \*4xN usando 1  $\mu\text{L}$  de la reacción de PCR-XL (diluido con  $\text{H}_2\text{O}$  1:10) amplificando un fragmento de 10 kb. Esta XL-PCR se llevó a cabo usando los primers 5'2D6dup y 3'2D6dup (Tabla XI). La amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  en

tubos de 0.2 mL y con 0.375  $\mu$ L de mezcla de las enzimas Taq y Pwo DNA Polymerase. La amplificación de 50 a 100 ng/ $\mu$ L de ADN genómico humano se realizó con 2.5  $\mu$ L de PCR buffer 2 (2.75 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 mM de cada dNTP y 0.3  $\mu$ M de cada primer (Tabla XI). Las condiciones fueron las siguientes: 2 minutos a 94 °C, seguidos de 10 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 30 segundos a 59 °C, 9 minutos con 30 segundos a 68 °C, seguidos de 20 ciclos más aumentando 10 segundos cada paso de 68 °C, y una extensión final de 11 minutos a 68 °C. El producto de la PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% y el ADN se visualizó con bromuro de etidio. Esta PCR creó un fragmento de 10 kb, el cual fue utilizado para el diagnóstico por PCR-RFLP. Todas las reamplificaciones se llevaron a cabo para detectar los alelos *CYP2D6*\*1xN, \*2xN y \*4xN. La Tabla XI resume todas las reacciones de amplificación que se realizaron.

**Tabla XI.** Primers y tamaño de las amplificaciones para la determinación de las multiplicaciones y delección del *CYP2D6*.

Forward	Reverse	Resultados (pb)
DPKup, 2D6dupl-F	DPKlow, 2D6dupl-R	<b>Gen 2D6:</b> 5100 <b>*1, *2, *4 xN:</b> 3500
DPKup, 5'2D6*5	DPKlow, 3'2D6*5	<b>Gen 2D6:</b> 5100 <b>*5:</b> 3500
5'2D6dup	3'2D6dup	<b>*1, *2, *4 xN:</b> 10000

**pb**= pares de bases; **N**= número de copias

#### 4.1.4. Detección del número de copias

Para el cálculo del número de copias de los individuos que dieron positivo para la presencia de multiplicaciones/duplicaciones del gen *CYP2D6* se utilizó RT-PCR basado en ensayos TaqMan de Número de Copias ("Copy Number Assays" ref. Hs00010001\_cn; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de amplificación consisten en 10 minutos de pre-incubación a 95 °C para activar la enzima Taq DNA polimerasa, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C de 15 segundos y luego "annealing" y extensión de 1 minuto a 60 °C. Todos los análisis se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en las cuales se incluyeron un control negativo (sin ADN) y controles positivos (heterocigóticos y homocigóticos).

El ensayo Hs0010001\_cn tiene como diana una secuencia específica del exón 9 del gen *CYP2D6*, pero no amplifica a los pseudogenes *CYP2D7* y *CYP2D8*, ni a los alelos del gen *CYP2D6* que llevan parte de la secuencia del pseudogen *CYP2D7* en el exón 9.

#### 4.1.5. Detección de los alelos *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35 y \*41

Para cada polimorfismo se utilizó un kit de reactivos con ensayos TaqMan predesarrollados, que contiene un par de primers de PCR y un par de sondas TaqMan con fluorescencia adquiridos a Applied Biosystems (Forster City, CA, EE.UU.) (Tabla XII), basado en la presencia de SNPs asociados a los alelos estudiados (-1584 C>G, 31 G>A, 100 C>T, 1023 C>T, 1707 T>del, 1846 G>A, 2549 A>del, 2988 G>A, 3183 G>A, 4180 G>C como se ha descrito previamente (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>).

**Tabla XII.** Sondas TaqMan utilizadas para la determinación de las variantes alélicas del *CYP2D6*.

Variante	dbSNP ID	Assay ID
<i>CYP2D6</i> *2	rs1080985	C_32407252_30
	rs16947	C_27102425_10
<i>CYP2D6</i> *3	rs35742686	C_32407232_50
<i>CYP2D6</i> *4	rs3892097	C_27102431_D0
<i>CYP2D6</i> *6	rs5030655	C_32407243_20
<i>CYP2D6</i> *10	rs1065852	C_11484460_40
<i>CYP2D6</i> *17	rs28371706	C_2222771_40
<i>CYP2D6</i> *29	rs59421388	C_34816113_20
<i>CYP2D6</i> *35	rs1080985	C_32407252_30
	rs769258	C_27102444_80
<i>CYP2D6</i> *41	rs28371725	C_34816116_20

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

La variante alélica *CYP2D6*\*2 se ha definido por la presencia de los SNPs -1584 C>G y 2850 C>T y la variante *CYP2D6*\*35 por la presencia de -1584 C>G y 31 G>A. La reacción de amplificación se realizó en 20 µL con 30 ng de ADN humano molde, 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA, EE.UU.), 1X de cada primer y sondas, y agua. Las condiciones iniciales fueron un paso de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 92 °C por 15 segundos, y alineación a 60 °C por 1 min. El proceso de detección alélica se llevó a cabo durante 1 min a 60 °C. Todos los

análisis se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en las cuales se incluyeron un control negativo (sin ADN) y controles positivos (heterocigóticos y homocigóticos).

## 4.2. Análisis de los genotipos *CYP2C9*

### 4.2.1. Detección de los alelos *CYP2C9*\*2, \*3, \*4, \*5 y \*6

Para determinar el genotipo *CYP2C9*\*2, \*3 y \*6 se utilizó discriminación alélica basada en fluorescencia con sondas TaqMan, y los alelos *CYP2C9*\*4 y *CYP2C9*\*5 se determinaron por PCR con las condiciones, primers y enzimas de restricción descritas en Llerena y cols. (2004). Para cada SNP *CYP2C9*\*2, \*3 y \*6, se utilizó un kit de reactivos con ensayos TaqMan prediseñados, que contiene un par de primers y un par de sondas TaqMan con fluorescencia (Applied Biosystems, Forster City, CA, EE.UU.) (Tabla XIII). La reacción de amplificación se realizó en 20 µL con 30 ng de ADN humano molde, 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA, EE.UU.), 1X de cada primer y sondas, y agua. Las condiciones iniciales fueron un paso de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 92 °C de 15 s, y alineación a 60 °C durante 1 min. El proceso de la discriminación alélicas se llevó a cabo mediante un último paso de 1 min a 60 °C.

**Tabla XIII.** Sondas TaqMan utilizadas para la determinación de las variantes alélicas del *CYP2C9*.

Variante	dbSNP ID	Assay ID
<i>CYP2C9</i> *2	rs1799853	C_25625805_10
<i>CYP2C9</i> *3	rs1057910	C_27104892_10
<i>CYP2C9</i> *6	-----	C_32287221_20

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

## 4.3. Análisis cromatográficos

En la presente Tesis se han desarrollado dos métodos cromatográficos: uno de ellos es un método HPLC con detección ultravioleta para detectar en plasma dextrometorfano y dextrorfano (Estudio I.1.) y el segundo es un método HPLC para la detección por fluorescencia de losartán y E-3174 en orina (Estudio II.1.).

#### **4.3.1. Procedimiento de extracción de las muestras**

##### **4.3.1.1. Estudio I.1 Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.**

Para el análisis de dextrometorfano y dextrorfano en plasma se utiliza plasma humano almacenado previamente en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Previo a su análisis, se realizó una extracción líquido-líquido. Se añadió una alícuota de 1 mL de plasma en un tubo de polipropileno de 10 mL junto con 20  $\mu\text{L}$  de la disolución de trabajo de levallorfan (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que fue utilizado como EI y se alcalinizó con 100  $\mu\text{L}$  de hidróxido sódico al 28%. Para la extracción líquido-líquido se utilizó 2 mL de hexano:diisopropil éter (80:20 v/v). Los tubos se taparon y se agitaron verticalmente durante 10 min, después se centrifugaron durante 10 min a 1000 g. La fase orgánica fue transferida a un tubo con 150  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 0.01 M. Esta mezcla fue vorteadada durante 5 min, y centrifugada después durante 10 min a 1000 g. La fase acuosa fue aspirada con una bomba de vacío, quedando únicamente la fase orgánica que posteriormente fue evaporada bajo una atmosfera de nitrógeno durante 30 min. Una vez que se evaporó toda la fase orgánica se reconstituyó con 100  $\mu\text{L}$  de fase móvil y se inyectaron en el equipo 20  $\mu\text{L}$  de esta disolución.

##### **4.3.1.2. Estudio II.1. Desarrollo y validación de un método de HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.**

Se realizó una extracción líquido-líquido. Para ello una alícuota de 1 mL de orina humana se añadió a un tubo de polipropileno de 10 mL, a este tubo se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de una solución metanol: agua (50:50, v/v) junto con 5 mL de MTBE. La mezcla fue vorteadada durante 30 segundos y después centrifugada a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. La muestra tras la centrifugación, se sometió a congelación, tras la congelación la fase orgánica se transfirió a un tubo de polipropileno nuevo. Esta se evaporó bajo una atmosfera de nitrógeno y el residuo fue reconstituido con 200  $\mu\text{L}$  de fase móvil. Finalmente una solución de 50  $\mu\text{L}$  fue inyectada en el sistema cromatográfico.



### **4.3.2. Preparación de la curva de calibración**

#### **4.3.2.1. Estudio I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.**

Se construyó una curva de calibración basada en los índices de las alturas de los picos obtenidos: altura del pico del analito/altura del pico del EI para todos los ensayos por la adición de cantidades conocidas de dextrometorfano y dexrorfano en plasma humano libre de fármacos. Se utilizaron concentraciones de los dos compuestos en el intervalo de concentraciones de 20-1000 ng/mL (20, 150, 300, 500, 650, 800 y 1000 ng/mL), el ensayo se realizó por triplicado. La cuantificación de los picos se realizó extrapolando la concentración (ng/mL) a la relación entre los índices de alturas de los picos obtenidos entre la altura del EI: (dextrometorfano/EI y dexrorfano/EI).

#### **4.3.2.2. Estudio II.1. Desarrollo y validación de un método de HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.**

Se construyó una curva de calibración basada en las alturas de los picos obtenidos para todos los ensayos por la adición de cantidades conocidas de losartán y E-3174 en orina humana libre de fármacos. Se utilizaron concentraciones de los dos compuestos en el intervalo de concentraciones de 10-800 ng/mL (10, 50, 100, 200 y 800 ng/mL), el ensayo se realizó por triplicado. La cuantificación de los picos se realizó extrapolando la concentración (ng/mL) a la relación entre los índices de alturas de los picos obtenidos: losartán/E-3174.

### **4.3.3. Condiciones cromatográficas**

#### **4.3.3.1. Estudio I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.**

La columna analítica empleada fue de fase reversa ACE 5 fenil (250 X 4.6 mm I.D.) con un tamaño de partícula de 5 µm (Columnas ACE HPLC). Se inyectaron 20 µL de la muestra en el sistema cromatográfico. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de dihidrógeno fosfato de potasio 10 mM (ajustado a pH 4.0 por adición de ácido ortofosfórico) y acetonitrilo (60:40, v/v). Antes del análisis, la fase móvil fue filtrada mediante un filtro de poliamida de 0.22 µm (Millipore, Bedford, EE.UU.) y desgasificada mediante ultrasonido durante 15 min. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La longitud de onda de detección seleccionada fue de 221 nm.

#### **4.3.3.2. Estudio II.1. Desarrollo y validación de un método de HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2C9.**

La columna analítica fue de fase reversa ACE 5 fenil (250 X 4.6 mm I.D.) con un tamaño de partícula de 5 µm (Columnas ACE HPLC). Se inyectaron 50 µL de la muestra en el sistema cromatográfico. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla de acetonitrilo y dihidrógeno fosfato disódico 20 mM (34:66, v/v) ajustado este último a pH 2.3 mediante ácido ortofosfórico. Esta fase móvil fue diariamente filtrada antes de cada análisis a través de un filtro de poliamida de 0.22 µm (Millipore, Bedford, EE.UU.). El ensayo se realizó a temperatura ambiente, con un flujo de trabajo mantenido a 1 mL/min. La longitud de onda de excitación seleccionado fue de 250 nm y la de emisión, 370 nm.

### **4.3.4. Validación del método analítico**

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 HPLC con detección ultravioleta en plasma humano de dextrometorfano y dexrorfano; y otro método HPLC con detección por fluorescencia en orina humana de losartán y E-3174. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros analíticos:

**Linealidad:** La linealidad se define como la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas linealmente proporcionales a la concentración del analito. En el **Estudio I.1.** la linealidad se ha determinado utilizando como sistema biológico el plasma blanco que se le añadió diferentes concentraciones de los analitos en un intervalo de concentración de 20-1000 ng/mL. Se realizó cada análisis por triplicado.

En el **Estudio II.1.** la linealidad se ha determinado utilizando como sistema biológico la orina blanco que se le añadió diferentes concentraciones de los analitos en un intervalo de concentración de 10-800 ng/mL. El análisis se realizó por triplicado.

Los criterios estadísticos de aceptación que se tuvieron en cuenta fueron el coeficiente de correlación lineal ( $r \geq 0.99$ ), el coeficiente de correlación cuadrático ( $r^2 \geq 0.98$ ) y la prueba de hipótesis nula de la pendiente ( $b=0$ ) con  $p < 0.05$ .

**Precisión:** 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, la reproducibilidad y la precisión intermedia.

La repetibilidad o precisión intradía, 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 en las tres concentraciones intermedias del intervalo de linealidad.

La precisión intermedia o precisión interdía es la repetición de dos curvas de calibración en días distintos, realizadas por analistas diferentes. La reproducibilidad del método se determinó en orina. El ensayo se realizó por triplicado.

En los cálculos de los porcentajes de los coeficientes de variación (CVs) para el estudio de estos parámetros, se utilizaron los índices de alturas de cada analito y cada una de las concentraciones, calculándose las medias de los porcentajes de los CVs para cada analito,

aceptándose valores de CVs menores del 15%:  $CV (\%) = (\text{desviación típica} / \text{media de concentraciones}) \times 100$ .

En el **Estudio I.1.** la repetibilidad y la precisión intermedia se realizó el ensayo por triplicado en tres concentraciones de la curva de calibración (20, 500 y 1000 ng/mL).

En el **Estudio II.1.** la repetibilidad y la precisión intermedia se realizó por sextuplicado en tres concentraciones intermedias de la curva de calibración (50, 100 y 200 ng/mL).

Exactitud: exactitud es la capacidad que tiene un método analítico para dar resultados próximos al valor verdadero. Para el cálculo de la exactitud de cada analito se utilizaron los índices de alturas de cada uno de ellos, calculando las concentraciones según los parámetros de la curva de calibración:  $(\text{Concentración práctica} / \text{Concentración teórica}) \times 100$ .

En el **Estudio I.1.** se realizó el ensayo se realizó por triplicado en tres concentraciones crecientes para cada analito (20, 500 y 1000 ng/mL). En el **Estudio II.1.** el ensayo se realizó por triplicado en tres concentraciones crecientes para cada analito (20, 100 y 200 ng/mL).

Recuperación: Se entiende por recuperación la diferencia que existe entre la cantidad de sustancia añadida a la muestra y la cantidad de sustancia que es detectada tras el procedimiento de extracción, es decir, la diferencia que existe entre las concentraciones obtenidas con una curva en medio acuoso (fase móvil) y con una curva en un fluido orgánico (sin fármacos). Para el cálculo del porcentaje de recuperación de cada analito se utilizaron los índices de altura, aceptándose una diferencia por encima del 50%:  $(\text{índice altura con extracción} / \text{índice altura sin extracción}) \times 100$ .

En el **Estudio I.1.** el ensayo se realizó por triplicado en tres concentraciones crecientes para cada analito (20, 500 y 1000 ng/mL), preparándose curvas de calibración en fase móvil y en plasma blanco. En el **Estudio II.1.** el ensayo se realizó por cuadruplicado en tres concentraciones crecientes para cada analito (20, 100 y 200 ng/mL), preparándose curvas de calibración en fase móvil y en orina blanco.

Sensibilidad: Para analizar la sensibilidad del método se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación para los analitos. El límite de cuantificación se define como la concentración más baja que presenta una precisión aceptable para todos los analitos. Para

su cálculo se analizaron tres concentraciones por triplicado, inferiores a la concentración mínima de la curva de calibración, considerándose como aceptables aquellas concentraciones en las que los valores de los CVs fueron menores del 15%. 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.

## 5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los estudios fueron realizados de acuerdo a las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, Junio de 1964), revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón, Octubre de 1975) y por la 35ª Asamblea Médica Mundial (Venecia, Italia, Octubre de 1983) (World Medical Association).

Antes de la realización de las pruebas, todos los sujetos fueron informados verbalmente y por escrito acerca de los objetivos, protocolos y características de los estudios y dieron su consentimiento por escrito para participar.

Los estudios previos fueron aprobados por el Comité de Bioética e Investigación de la Universidad Central del Ecuador y por el Comité de Ética del Hospital Universitario “Infanta Cristina” de Extremadura y la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España).

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa informático GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). En los estudios de la Tesis un *p*-valor menor de 0.05 se tomó como estadísticamente significativo.

### 6.1. ESTUDIO I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

Los IM dextrometorfano/dextrorfano fueron transformados a escala logarítmica, primero analizado por una ANOVA de una vía. Cuando los resultados fueron significativos, se realizó una comparación de medias a través de una *t* de Student.

El análisis de las variaciones inter-individuales en el IM fueron expresadas por un gráfico de la función probit y el histograma de frecuencias de distribución del número de sujetos frente al log IM. La antimoda fue determinada por una regresión lineal desde el gráfico de la función probit. Para hacer el test de normalidad de la distribución de IM se ha utilizado el test de Shapiro-Wilk.

La correlación entre “activity scores” o puntuaciones de actividad y los IMs analizó usando el coeficiente de correlación de Spearman. Las medias de los IM para los diferentes “activity scores” fueron comparadas usando el test no-paramétrico Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

### 6.3. ESTUDIO II. Fenotipo metabólico de losartán y genotipos *CYP2C9* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

El IM losartán/E-3174 fue transformado a una escala logarítmica y comparado con el test no-paramétrico Kruskal-Wallis y con el test de Dunn de comparación múltiple. *P*-valores menores de 0.05 fueron tomados como estadísticamente significativos.

El IM de losartán/E-3174 fue comparado con los grupos de los diferentes genotipos de *CYP2C9* por el test de análisis de la varianza de una vía. Un test post-hoc de Fisher se utilizó para calcular las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Para evaluar la influencia del género, hábitos de consumo de tabaco, cafeína o alcohol en el IM losartán/E-3174 se utilizó una t-Student. El equilibrio Hardy–Weinberg se determinó para comparar las frecuencias genotípicas esperadas con las observadas a través de una tabla de contingencia  $\chi^2$  con la corrección de Yates. Las diferencias en las frecuencias alélicas del *CYP2C9* se compararon usando el test exacto de Fisher. Para calcular las diferencias entre los IM losartán/E-3174 entre diferentes poblaciones se utilizó un test t-Student.



## IV. RESULTADOS

Página

---

<b>1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DEXTROMETORFANO Y GENOTIPOS <i>CYP2D6</i> EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.....</b>	77
1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del <i>CYP2D6</i> .....	77
1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos <i>CYP2D6</i> en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	79
<b>2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS <i>CYP2C9</i> EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.....</b>	85
2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del <i>CYP2C9</i> .....	85
2.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos <i>CYP2C9</i> en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	89

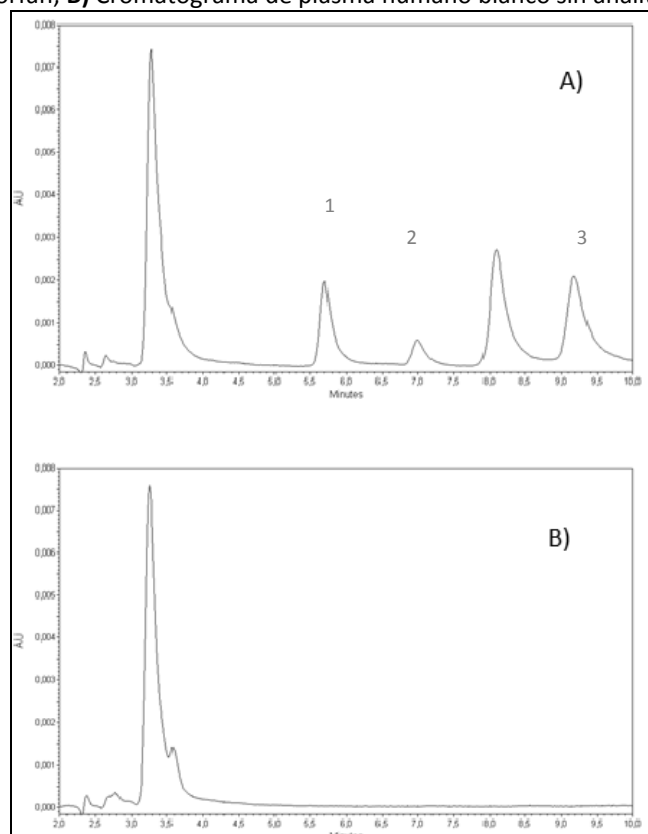
---

## 1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DETROMETORFANO Y GENOTIPOS *CYP2D6* EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.

### 1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del *CYP2D6*.

Para la detección y posterior análisis de dextrometorfano y su principal metabolito (dextrorfano) en plasma, se desarrolló y validó un nuevo método de HPLC con detección por ultravioleta, tal y como se describió en la sección Material y Métodos. La Figura 8 muestra un cromatograma obtenido del análisis de dextrometorfano y su principal metabolito dextrorfano en plasma blanco humano al que se le habían añadido ambos analitos (dextrometorfano y dextrorfano) y levallorfan (EI).

**Figura 8.** Cromatogramas de plasma humano con dextrometorfano, levallorfan y dextrorfano. **A)** Cromatograma de plasma humano blanco en el que se le ha añadido dextrometorfano, dextrorfano y levallorfan; **B)** Cromatograma de plasma humano blanco sin analitos.



1) dextrorfano; 2) levallorfan; 3) dextrometorfano.

Con este método se logró una separación satisfactoria de todos los analitos de estudio, tal y como se observa en el cromatograma (Figura 8). Los tiempos de retención para los analitos estudiados fueron 5.7, 6.9 y 9.3 minutos para dextrorfano, levallorfan y dextrometorfano, respectivamente (Figura 8).

#### **1.1.1. Linealidad del método**

El análisis de la linealidad fue calculado por triplicado dentro del intervalo de concentraciones de 20 a 1000 ng/mL (20, 150, 300, 500, 650, 800 y 1000 ng/mL), se obtuvo una media de 0.999 y 0.994 para dextrorfano y dextrometorfano, respectivamente. Además, el método se mantuvo lineal ( $r^2 > 0.98$ ) para todas las concentraciones de los dos analitos (dextrometorfano y dextrorfano) dentro del rango de concentraciones estudiado.

#### **1.1.2. Recuperación, exactitud, precisión y sensibilidad del método**

La media del porcentaje de recuperación de dextrometorfano y dextrorfano calculada en tres diferentes concentraciones (20, 500 y 1000 ng/ml) fue de 99.1% y 95.7% (n=3), respectivamente (Tabla XIV).

La media del porcentaje de exactitud para las tres concentraciones intermedias 20, 500 y 1000 ng/mL fue de 108.9% para dextrometorfano y 97.3% para dextrorfano (Tabla XIV).

Los porcentajes de los coeficientes de variación (%) intradía e interdía fueron menores del 10% para todos los analitos (Tabla XIV).

El límite de cuantificación fue de 10 y 15 ng/ml para dextrometorfano y dextrorfano, respectivamente. El límite de detección fue de 5 ng/mL para ambos analitos.

**Tabla XIV.** Recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método para medir dextrometorfano y dextrorfano.

Analito	Concentraciones (ng/ml)	Recuperación (%)	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)	Exactitud (%)
Dextrometorfano	20	92.8	10.479	5.62	114.4
	500	98.7	0.697	6.43	108.7
	1000	105.8	4.821	8.26	103.8
Dextrorfano	20	91.6	6.039	9.95	106.5
	500	96.3	2.792	7.37	92.0
	1000	99.2	3.378	6.59	93.4

%CV=porcentaje del coeficiente de variación.

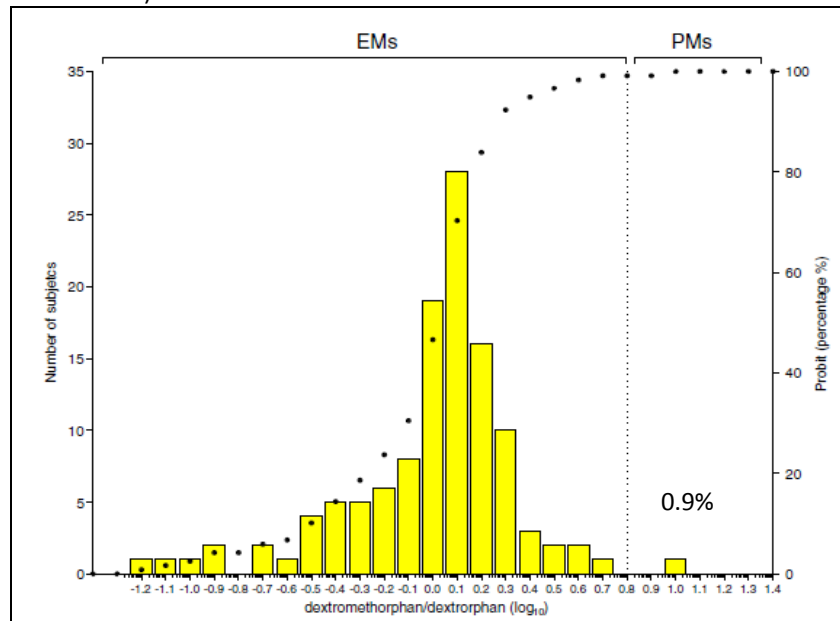
## 1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Ecuador.

### 1.2.1. Metabolismo de dextrometorfano en una población de voluntarios sanos de Ecuador

El metabolismo de dextrometorfano se estudió en una población de 118 voluntarios sanos mestizos de Ecuador en muestras de plasma recogidas a las tres horas después de la ingesta de 30 mg de dextrometorfano.

El histograma de los IM reveló una distribución bimodal de la actividad del citocromo *CYP2D6* en la población estudiada (Figura 9). En esta población el intervalo de los  $\log_{10}$  IM estuvo entre -1.2 y 1.0.

**Figura 9.** Histograma de los Índices Metabólicos (IM) de dextrometorfano/dextrorfano en muestras de plasma recogidas a las 3 horas obtenidas de 118 voluntarios sanos. (de Dorado y cols., 2012b. Anexo Publicaciones).

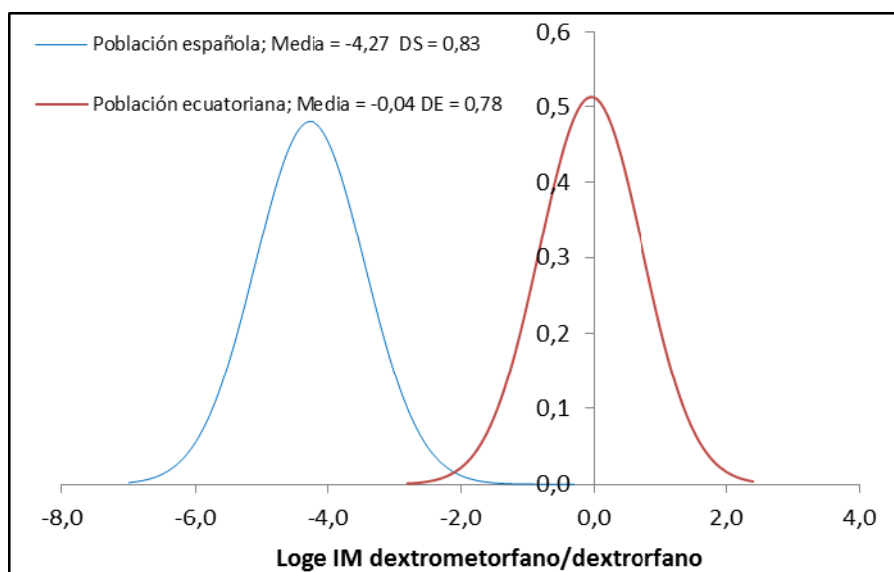


EMs= metabolizadores rápidos; PMs= metabolizadores lentos

Dextrometorfano y dextrorfano fueron cuantificados usando el método desarrollado y descrito en el Estudio I.1 de la presente Tesis. El test de normalidad de Shapiro-Wilk para los valores de IM indicó que se comportaron con una distribución no normal. Considerando el gráfico de la función probit y basado en una inspección visual de las frecuencias de distribución el valor de corte 0.8 ( $\log_{10}$ ) se usó para separar los PMs de los EMs. Aplicando por tanto este valor como punto de corte, uno de los sujetos fue clasificado como PM, del total de la muestra sería un 0.9% [95% de intervalo de confianza (IC) 0.01-5.11]. El resto de la población, los 117 voluntarios sanos fueron clasificados como EMs.

Si comparamos estos resultados con la población española que también fue fenotipada con dextrometorfano (Henthorn y cols., 1989), observamos que existen diferencias. El porcentaje de PM en la población española fue más alto que en nuestra población de estudio, 10% ( $n=146$ ) frente a un 0.9% ( $n=118$ ). Además, si observamos solamente el grupo de EM, la media del índice metabólico de este grupo en la población ecuatoriana es de -0.042 ( $\log_e$  dextrometorfano/dextrorfano) frente a -4.27 ( $\log_e$  dextrometorfano/dextrorfano) de la población española (Henthorn y cols., 1989), lo que claramente muestra que la población ecuatoriana tiende a ser más lenta que la española (Figura 10).

**Figura 10.** Curvas de distribución de los  $\text{Log}_e$  de los IM dextrometorfano/dextrorfano de la población ecuatoriana y española. [línea azul= distribución de la población española; línea roja= población ecuatoriana].



IM= Índice Metabólico.

Si observamos otra población española de 925 voluntarios sanos fenotipada con debrisoquina (Llerena y cols., 2009), que es otro fármaco-test para evaluar la actividad de la enzima CYP2D6, encontramos un 4.9% de metabolizadores lentos, además en la población española encontramos un 5.2% de UMs mientras que en la población ecuatoriana no encontramos ningún individuo.

No se encontró ninguna diferencia entre las variables analizadas como fueron: el género, edad, consumo de tabaco y cafeína y los IM.

### **1.2.2. Frecuencias genotípicas y alélicas del CYP2D6 en una población de voluntarios sanos de Ecuador**

Los genotipos del CYP2D6 y sus frecuencias alélicas para esta población de voluntarios sanos se representan en las Tablas XV y XVI. Sólo uno de los sujetos fue clasificado como PM (con cero genes activos) y no se encontraron individuos UMs (3 o más genes activos), aunque se observó que un 2.6% de la población presentó un "activity score" de 2.5. La frecuencias de

los alelos funcionales (\*1, \*2, \*35) fue del 80.1%, mientras que las frecuencias de alelos con actividad reducida (\*10, \*17, \*29, \*41), actividad nula (\*3, \*4, \*5, \*6, \*4xN) y los hipotéticamente incrementados (\*1xN, \*2xN) fueron del 5.1, 14 y 0.8%, respectivamente.

**Tabla XV.** Frecuencias genotípicas observadas y esperadas del *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Ecuador.

Genotipo	Activity Score	N	Frecuencias Observadas (%)	IC 95%	N	Frecuencias Esperadas (%)	IC 95%
*4/*4	0	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*4/*10	0.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*5/*41	0.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	0	0	0.0000 - 0.0379
*2/*4	1	10	8.5	0.0451 - 0.1506	8	6.8	0.0329 - 0.1300
*2/*4x2	1	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*1/*4x2	1	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*2/*5	1	2	1.7	0.0008 - 0.0635	2	1.7	0.0008 - 0.0635
*1/*3	1	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*1/*4	1	12	10.2	0.0578 - 0.1707	12	10.2	0.0578 - 0.1707
*1/*5	1	2	1.7	0.0008 - 0.0635	3	2.5	0.0054 - 0.0753
*2/*41	1.5	2	1.7	0.0008 - 0.0635	2	1.7	0.0008 - 0.0635
*2/*17	1.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	0	0	0.0000 - 0.0379
*1/*10	1.5	2	1.7	0.0008 - 0.0635	2	1.7	0.0008 - 0.0635
*1/*41	1.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	3	2.5	0.0054 - 0.0753
*1/*29	1.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*2/*29	1.5	1	0.8	<0.0001 - 0.0402	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*1/*1	2	30	25.4	0.1839 - 0.3401	27	22.9	0.1618 - 0.3129
*1/*2	2	33	28.0	0.2063 - 0.3669	35	29.7	0.2214 - 0.3846
*2/*2	2	11	9.3	0.0514 - 0.1607	12	10.2	0.0578 - 0.1707
*2/*35	2	2	1.7	0.0008 - 0.0635	1	0.8	<0.0001 - 0.0511
*2x2/*41	2.5	1	0.8	<0.0001 a 0.0402	0	0	0.0000 - 0.0379
*1x2/*41	2.5	1	0.8	<0.0001 a 0.0402	0	0	0.0000 - 0.0379
<b>Total</b>		<b>118</b>			<b>118</b>		

n= número de individuos

Las frecuencias alélicas encontradas en esta población se muestran en la Tabla XVI, en ambas poblaciones de voluntarios sanos se observa que el alelo más frecuente es el *wt*.

**Tabla XVI.** Frecuencias alélicas de *CYP2D6* de la población ecuatoriana y española.

Alelo	Ecuador			España		
	n	Frec.	IC 95%	N	Frec.	IC 95%
*1	113	0.479	0.4159 – 0.5424	459	0.702	0.6657 – 0.7357
*2	74	0.314	0.2577 – 0.3754	Ne	-	-
*3	1	0.004	<0.0001 – 0.0261	3	0.005	0.00009 – 0.0141
*4	25	0.106	0.0723 – 0.1522	121	0.185	0.1571 – 0.2166
*5	5	0.021	0.0077 – 0.0500	9	0.014	0.0068 – 0.0264
*6	0	0.000	0.0000 – 0.0193	20	0.031	0.0196 – 0.0470
*10	3	0.013	0.0026 – 0.0385	13	0.020	0.0113 – 0.0341
*17	1	0.004	<0.0001 – 0.0261	0	0.000	0.0000 – 0.0070
*29	2	0.008	0.0003 – 0.0324	Ne	-	-
*35	2	0.008	0.0003 – 0.0324	Ne	-	-
*41	6	0.025	0.0104 – 0.0556	Ne	-	-
<i>wt</i> xN	2	0.008	0.0003 – 0.0324	27	0.041	0.0283 – 0.0596
*4xN	2	0.008	0.0003 – 0.0324	2	0.003	<0.0001 – 0.0118
Total	236	1.000		654	1.000	

n=número de individuos; Frec.= frecuencias alélicas; Ne= no estudiado; N= número de copias.

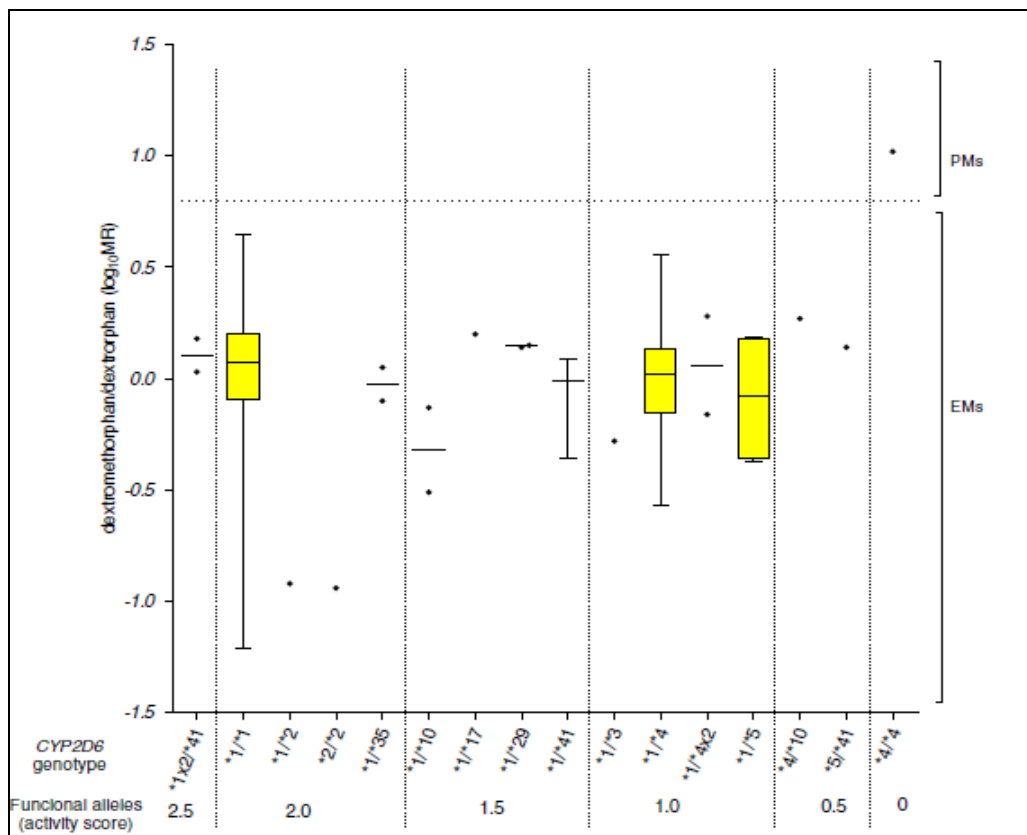
Una diferencia a destacar es la ausencia del alelo *CYP2D6*\*6 en la población ecuatoriana y la presencia de este en un 3% aproximadamente en la población española. En cambio, en la población ecuatoriana nos encontramos el alelo \*17 que en la población española está ausente. Además, las variantes que se encuentran multiplicadas en la población española se encuentran en un mayor porcentaje que en la población ecuatoriana.

### 1.2.3. Relación fenotipo – genotipo *CYP2D6*

La media  $\pm$  DS (n) de los valores de IM de los 118 voluntarios sanos con un “activity score” de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 fue de 10.57 (n=1), 1.63 $\pm$ 0.35 (n=2), 1.16 $\pm$ 0.74 (n=29), 1.00 $\pm$ 0.47 (n=8), 1.24 $\pm$ 0.82 (n=76) y 1.30 $\pm$ 0.32 (n=2), respectivamente. El sujeto con el IM dextrometorfano/dextrorfano más alto (IM= 10.57; log<sub>10</sub> IM=1.02) tenía dos copias inactivas del alelo *CYP2D6*\*4 (Figura 11).



**Figura 11.** Relación entre los ratios metabólicos de dextrometorfano/dextrorfano en muestras de plasma recogidas a las 3 h y los genotipos de *CYP2D6* de 118 voluntarios sanos (Dorado y cols., 2012b. Anexo Publicaciones).

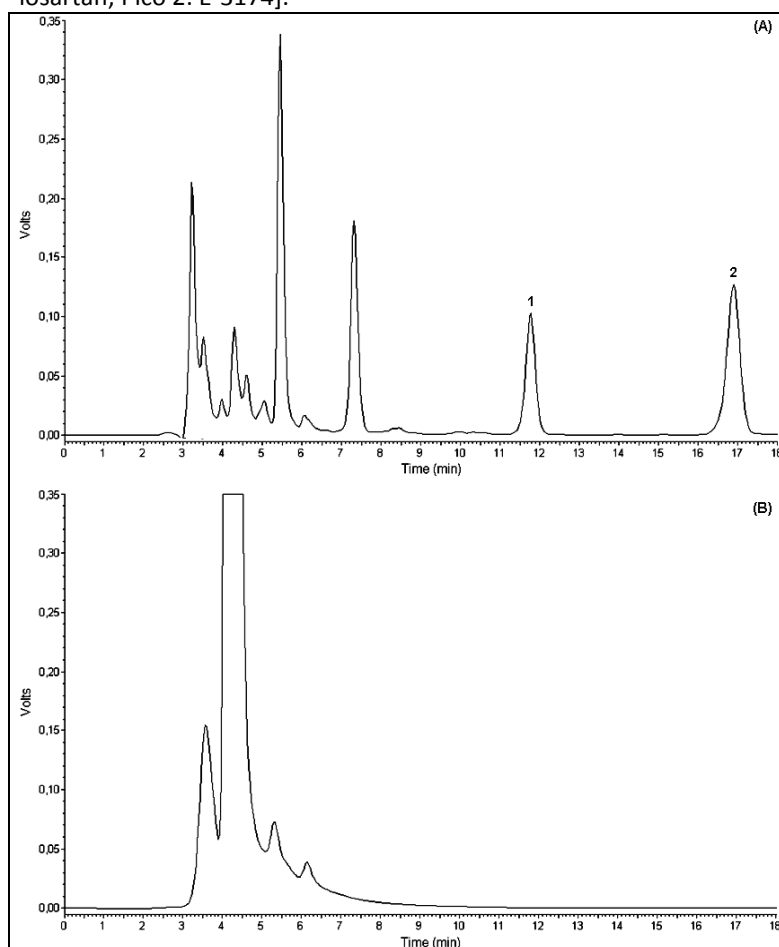


## 2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS *CYP2C9* EN UNA POBLACIÓN ECUATORIANA RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.

### 2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos.

Para la detección y posterior análisis de losartán y su metabolito (E-3174) en orina, se desarrolló y validó un nuevo método de HPLC-fluorescencia, tal y como se describió en la sección de Material y Métodos. La Figura 12 muestra un cromatograma obtenido tras el análisis de losartán y su principal metabolito E-3174 en orina humana con los dos analitos añadidos Figura 12 (A) y otro de orina humana blanco sin los analitos añadidos Figura 12 (B).

**Figura 12.** Cromatogramas obtenidos de orina humana con los dos metabolitos añadidos (A) y de orina humana blanco (B). [Pico 1: losartán; Pico 2: E-3174].



Con este método se logró una separación satisfactoria de todos los analitos en estudio y que no se detectó ninguna interferencia, tal y como puede observarse en los dos cromatogramas (Figura 12). Los tiempos de retención para los analitos estudiados fueron satisfactorios para el trabajo de rutina del laboratorio  $11.7 \pm 0.3$  min para losartán y de  $16.7 \pm 0.4$  min para E-3174.

Para cada análisis se realizó una curva de calibración diferente por triplicado. Se usaron cinco concentraciones, en el intervalo de 10 a 800 ng/ml.

### **2.1.1. Linealidad del método**

El análisis de linealidad fue calculado para cinco concentraciones por triplicado en el rango de concentración de 10-800 ng/mL (10, 50, 100, 200, 800 ng/mL). Se obtuvo una media para  $r^2$  para ambos metabolitos de 0.999. Además, el método se mantuvo lineal dentro del rango de concentraciones estudiado.

### **2.1.2. Recuperación, exactitud, precisión y sensibilidad del método**

La media del porcentaje de **recuperación** fue del  $99.6 \pm 1.8\%$  para losartán y  $98.4 \pm 7.3\%$  para E-3174 en las concentraciones 50, 100 y 200 ng/ml en análisis por cuadruplicado (Tabla XVII).

La media del porcentaje de **exactitud** para las tres concentraciones intermedias 50, 100 y 200 ng/mL fue de  $94.4 \pm 5.6\%$  para losartán y  $101.3 \pm 7.6\%$  para E-3174. Los porcentajes de los CV fueron 5.9% y 7.5% para losartán y su metabolito respectivamente (Tabla XVII).

Los porcentajes de los CV intradía e interdía fueron menores del 10% para ambos analitos (n=6) (Tabla XVII).

El límite de cuantificación fue 2 y 5 ng/mL para losartán y E-3174, respectivamente y el límite de detección fue de 1 ng/mL para ambos analitos.

**Tabla XVII.** Recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método para medir losartán y E-3174.

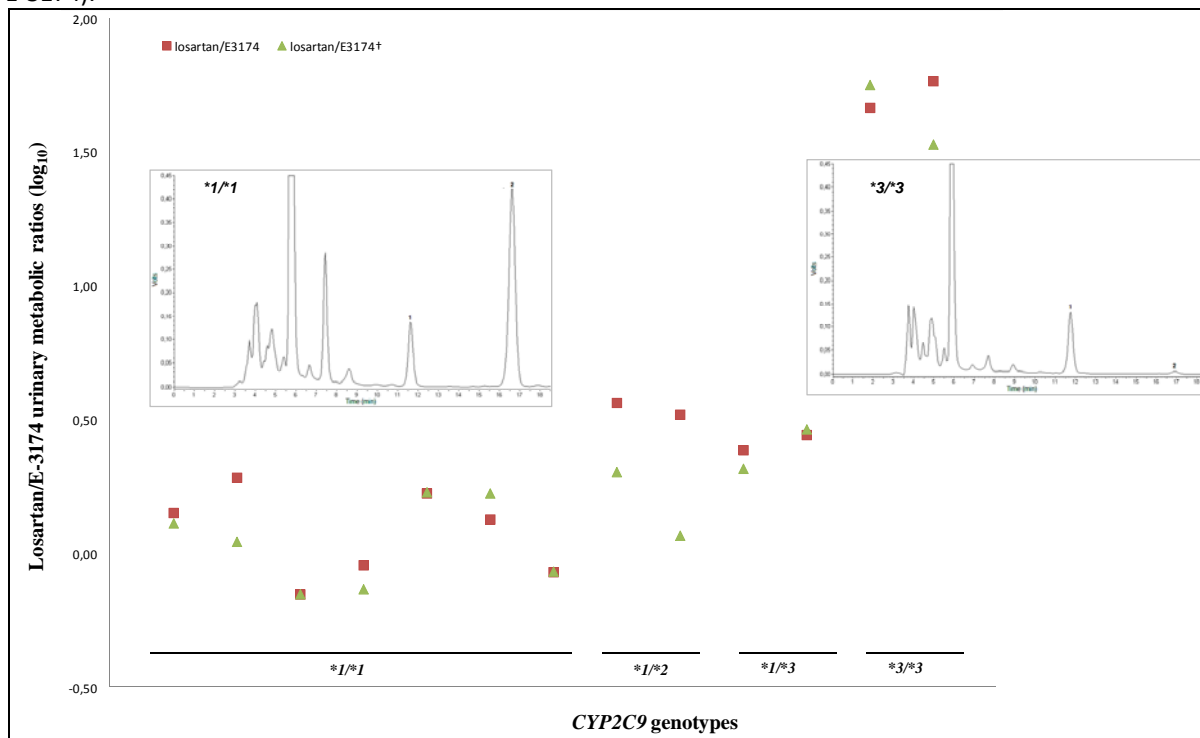
Analito	Concentraciones (ng/ml)	Recuperación (%)	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)	Exactitud (%)
Losartán	50	102	2.61	8.14	91.9
	100	97.6	10.35	5.69	97.1
	200	99.3	5.56	6.68	94.1
E-3174	50	105	5.47	10.19	96.3
	100	102	4.93	11.99	103.7
	200	88.2	2.69	5.70	103.9

%CV= porcentaje del Coeficiente de Variación.

### **2.1.3. Aplicación del método en un panel de voluntarios sanos**

El IM losartán/E-3174 fue estudiado en un panel de voluntarios sanos formado por 13 individuos españoles (8 mujeres y 5 hombres) previamente analizados con otro método HPLC (Yasar y cols., 2002a). Se observó que los IM losartán/E-3174 fueron similares a aquellos reportados previamente (Yasar y cols., 2002a) (Figura 13). Además, como en el estudio previo se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los IM losartán/E-3174 entre los cuatro grupos de genotipos.

**Figura 13.** Relación entre  $\log_{10}$ IM losartán/E-3174 y genotipos del *CYP2C9* en 13 voluntarios sanos analizados con este nuevo método y otro previamente publicado († Yasar y cols., 2002a). Los cromatogramas fueron obtenidos del análisis de muestras de orina de individuos *CYP2C9*\*1/\*1 y *CYP2C9*\*3/\*3 (Pico 1: losartán, Pico 2: E-3174).



## **2.2. ESTUDIO II.2. Estudio del metabolismo de losartán, genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.**

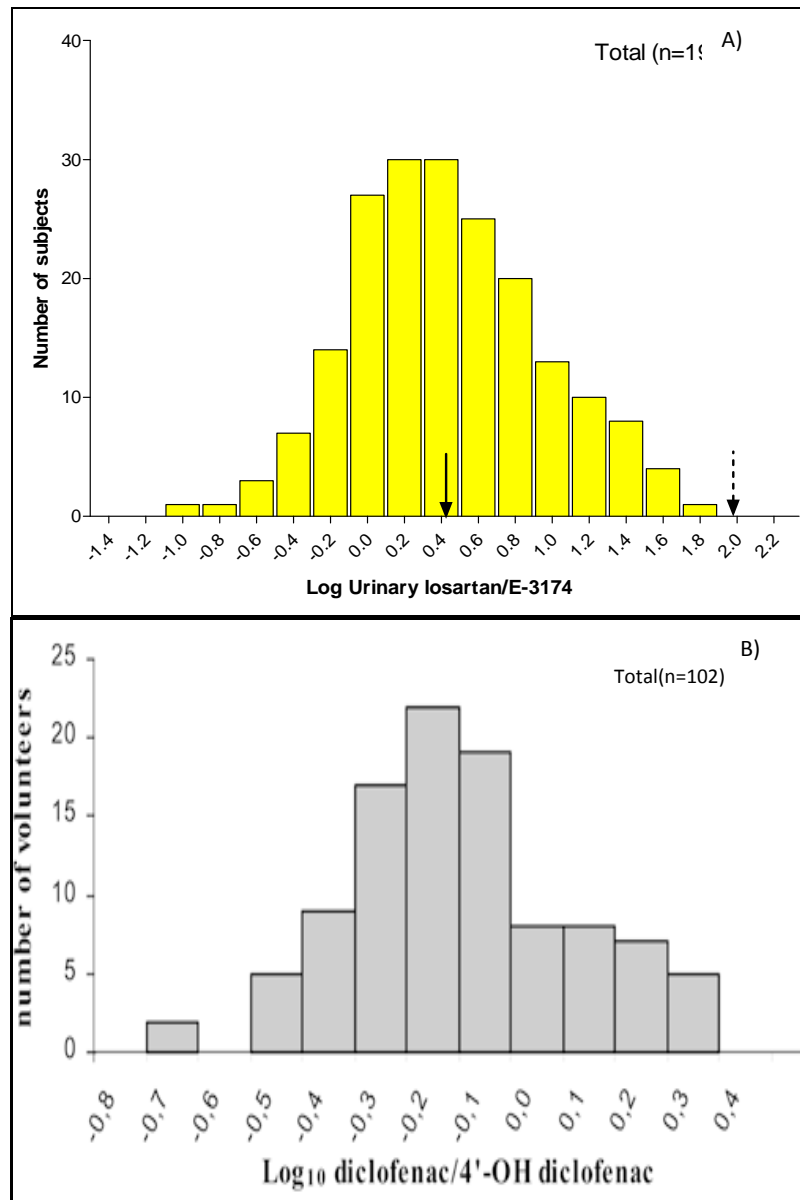
### ***2.2.1. Metabolismo de losartán en una población de voluntarios sanos de Ecuador***

El metabolismo de losartán se estudió en una población de 194 voluntarios sanos mestizos de Ecuador en muestras de orina recogidas tras las ocho horas después de la toma de una dosis única de 25 mg de losartán (Figura 14 A).

El histograma de los IM losartán/E-3174 mostró una gran variabilidad interindividual en esta población aunque presenta una distribución unimodal (Figura 14 A). El intervalo del  $\log_{10}$ IM para la población estudiada se encontró entre el -1.0 y 1.8 (IM losartán/E-3174:0.08-52.7).

Ningún sujeto pudo ser clasificado como PM, al igual que ha ocurrido con otras poblaciones estudiadas con losartán y otros fármacos test (Tabla VI).

**Figura 14. (A)** Histograma del  $\log_{10}$  de los IM de losartán/E-3174 en muestras de orina recogidas a las 8 horas obtenidas de 194 voluntarios sanos de Ecuador (la línea muestra la media del  $\log_{10}$  de los IM de losartán/E-3174 de toda la población. La flecha continua muestra la media de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 en toda la población. La flecha discontinua muestra el hipotético punto de corte del grupo PM calculado a partir de las medias de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 de los individuos CYP2C9\*3/\*3 recogidas de (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004). **(B)** Histograma de los IM diclofenaco/4'-OHdiclofenaco en una población de voluntarios sanos españoles (Dorado y cols., 2003c).



Si comparamos con la población española (n=102) en la que se analizó el fenotipo metabólico con diclofenaco (Dorado y cols., 2003c), en ambas poblaciones no se pudo diferenciar metabolizadores lentos, las dos mostraron una distribución unimodal como se muestra en las Figuras 14 A y 14 B. Si observamos la distribución en ambas

poblaciones, la población ecuatoriana es más variable que la española ya que el rango de distribución es mayor en la primera con respecto a la segunda población.

### 2.2.2. Frecuencias genotípicas y alélicas del CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador

Las frecuencias de los genotipos CYP2C9 en esta población de voluntarios sanos se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (test Chi cuadrado,  $p > 0.05$ ) (Tabla XVIII). Estas frecuencias fueron 86.1%, 10.8% y 3.1% para los genotipos CYP2C9\*1/\*1, CYP2C9\*1/\*2 y CYP2C9\*1/\*3, respectivamente. Tampoco se pudo clasificar ningún sujeto como genotípicamente lento ya que no se encontró ningún sujeto homocigoto para CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 o heterocigoto CYP2C9\*2/\*3.

**Tabla XVIII.** Porcentaje de los genotipos observados y esperados del CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador (n=194).

CYP2C9 Genotipo	Frecuencia Observada			Frecuencia Esperada		
	N	%	95% IC	N	%	95% IC
CYP2C9*1/*1	167	86.1	81.2-91.0	168	86.6	81.8-91.4
CYP2C9*1/*2	21	10.8	6.5-15.2	20	10.3	6.0-14.6
CYP2C9*1/*3	6	3.1	0.7-3.5	5	2.6	0.3-4.8
CYP2C9*2/*2	0	---	---	1	0.5	0.0-1.5
CYP2C9*2/*3	0	---	---	0	0.0	0.0-0.0
CYP2C9*3/*3	0	---	---	0	0.0	0.0-0.4

**N=** número de individuos; **IC=** Intervalo de Confianza



Las frecuencias alélicas de los diferentes alelos estudiados fueron del 93% (95% IC= 0.905-0.956), 5.4% (95% IC= 0.032-0.077) y del 1.5% (95% IC= 0.003-0.028) para los alelos *CYP2C9*\*1, \*2 y \*3, respectivamente. No se encontraron individuos que portasen las variantes alélicas *CYP2C9*\*4, \*5, \*6.

Las frecuencias de las variantes *CYP2C9*\*2 y \*3 observadas en población ecuatoriana fueron menores ( $p < 0.05$ ) que las observadas en la población española (Tabla XIX).

**Tabla XIX.** Frecuencias alélicas de *CYP2C9* de la población ecuatoriana y española.

Alelos	Ecuador			España*		
	N	Frac.	95% IC	N	Frac.	95% IC
*1	361	0.93	0.9003 – 0.9521	152	0.745	0.5033 – 0.6208
*2	21	0.054	0.0353 – 0.0817	32	0.156	0.1988 – 0.3580
*3	6	0.015	0.0063 – 0.0341	20	0.098	0.1117 – 0.2481
*4	0	0	0.0000 – 0.0379	Ne	-	-
*5	0	0	0.0000 – 0.0379	Ne	-	-
*6	0	0	0.0000 – 0.0379	Ne	-	-
Total	388			204		

**N**= número de individuos; **Frec.**= frecuencias alélicas; **IC**= Intervalo de Confianza; **Ne**= no estudiado; \*(Dorado y col., 2003c)

### 2.2.3. Influencia genético ambiental en el fenotipo del CYP2C9

El IM de losartán/E-3174 (Figura 15) fue significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) entre los individuos con genotipo *CYP2C9*\*1/\*3 que los individuos con genotipo *CYP2C9*\*1/\*1 (Tabla XX).

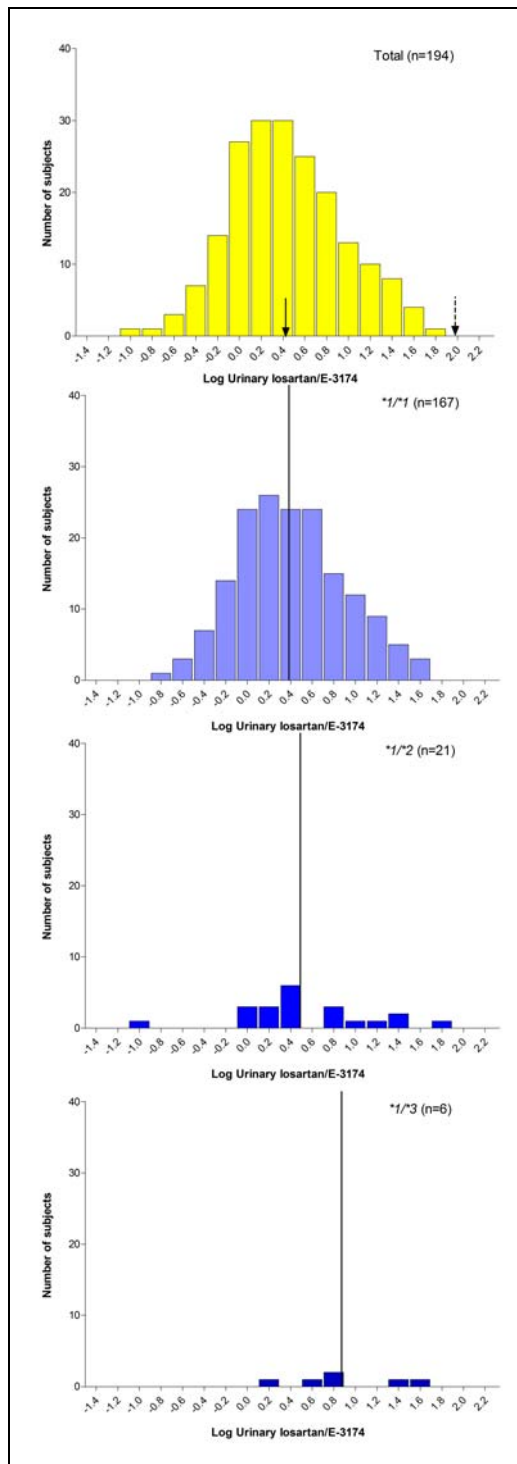
**Tabla XX.** IM losartán/E-3174 entre los diferentes genotipos en una población de 194 voluntarios sanos.

<i>CYP2C9</i> Genotipo	IM losartán/E-3174		
	N	Media	DS
<i>CYP2C9</i> *1/*1	167	4.9	7.0
<i>CYP2C9</i> *1/*2	21	7.8	12.4
<i>CYP2C9</i> *1/*3	6	12.4	13.8
<i>CYP2C9</i> *2/*2	0	---	--
<i>CYP2C9</i> *2/*3	0	---	--
<i>CYP2C9</i> *3/*3	0	---	--

N= número de sujetos; DS= desviación estándar

La media del IM en los individuos *CYP2C9*\*1/\*1 fue más baja que la que presentaban los individuos con genotipo *CYP2C9*\*1/\*2, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Tabla XX).

**Figura 15.** Histogramas de los IM de losartán/E-3174 en los diferentes genotipos de una población de 194 voluntarios sanos. La flecha continua muestra la media de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 en toda la población. La flecha discontinua muestra el hipotético punto de corte del grupo PM calculado a partir de las medias de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 de los individuos *CYP2C9*\*3/\*3 recogidas de (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004). La línea continua muestra la media de los IM en cada grupo de genotipos.



Por otro lado, si comparamos las medias observadas en esta población de Ecuador y en el panel de voluntarios sanos fenotipados con losartán, podemos observar como la media del IM de losartán/E3174 es mayor en la población ecuatoriana que en la española en cada uno de los grupos genotípicos del *CYP2C9* (Tabla XXI).

**Tabla XXI.** Comparación de los genotipos *CYP2C9* y el Índice Metabólico losartán/E-3174 de muestras recogidas entre las 0-8 horas en la población ecuatoriana y un panel de voluntarios sanos españoles (Estudio II.1).

Genotipo <i>CYP2C9</i>	Españoles			Ecuatorianos		
	N	Media	DS	N	Media	DS
<i>CYP2C9</i> *1/*1	7	1.18*	0.39	167	4.9	7.0
<i>CYP2C9</i> *1/*2	2	1.64*	0.53	21	7.9	12.4
<i>CYP2C9</i> *1/*3	2	1.70*	0.33	6	12.4	13.8
<i>CYP2C9</i> *2/*2	0	--	--	0	--	--
<i>CYP2C9</i> *2/*3	0	--	--	0	--	--
<i>CYP2C9</i> *3/*3	2	38.71	--	0	--	--

N= número de individuos; \*p<0.05 comparadas con la Media±DS de la población ecuatoriana mediante test t-Student.

No se encontró una asociación entre los hábitos de consumo de tabaco, alcohol o cafeína con la variabilidad en los IM losartán/E-3174 en esta población. Lo que sí se pudo observar fue la existencia de diferencias en la media del IM losartán/E-3174 ( $p<0.05$ ) entre mujeres ( $n=112$ ) y hombres ( $n=82$ ), independientemente del genotipo *CYP2C9* que presentaban (Tabla XXII).

Para evitar la influencia del factor genotipo *CYP2C9*, se compararon también sólo aquellos individuos que portaban el genotipo *CYP2C9*\*1/\*1, manteniéndose esta diferencia ( $p<0.05$ ) (Tabla XXII).

**Tabla XXII.** IM losartán/E-3174 dividido por género.

	Total		Genotipo CYP2C9*1/*1	
	Hombres (n=82)	Mujeres (n=112)	Hombres (n=73)	Mujeres (n=94)
<b>IM losartán/E-3174 (Media ± DS)</b>	3.76±4.48*	6.72±9.72	3.63±4.22*	5.92±8.40

**N**= número de sujetos; **DS**= desviación estándar. \*p<0.05 comparadas con la Media±DS que presenta el grupo de mujeres mediante test t-Student

## V. DISCUSIÓN

Página

---

<b>1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DEXTROMETORFANO Y GENOTIPOS <i>CYP2D6</i> EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO A LA ESPAÑOLA.....</b>	<b>98</b>
1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del <i>CYP2D6</i> .....	98
1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos <i>CYP2D6</i> en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	100
<b>2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS <i>CYP2C9</i> EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO A LA ESPAÑOLA.....</b>	<b>104</b>
2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del <i>CYP2C9</i> .....	104
2.2. ESTUDIO II.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos <i>CYP2C9</i> en una población de voluntarios sanos de Ecuador.....	106

---

## **1. ESTUDIO I. FENOTIPO METABÓLICO DE DETROMETORFANO Y GENOTIPOS CYP2D6 EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.**

### **1.1. ESTUDIO I.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de dextrometorfano en plasma para su uso en estudios farmacogenéticos del CYP2D6.**

En este estudio se ha desarrollado un nuevo método analítico de HPLC con detección UV para la cuantificación simultánea en plasma humano de dextrometorfano y su principal metabolito dextrorfano después de la toma de una única dosis de 30 mg de dextrometorfano.

Se han desarrollado diferentes métodos de HPLC en plasma para la determinación de dextrometorfano previos a este estudio. La mayoría de los métodos publicados en plasma utilizan HPLC-MS/MS (Eichhold y cols., 2007; Kumar y cols., 2007; Mc Cauley-Myers y cols., 2000), este tipo de metodología es bastante más compleja que el nuevo método aquí desarrollado que utiliza HPLC con detección por ultravioleta, algo más sencillo. Asimismo, el método desarrollado por Kumar y cols. (2007), además de usar espectrometría de masas tiene acoplado al equipo un detector de fluorescencia para detectar otros analitos, lo que le añade algo más de complejidad. Otros métodos publicados utilizan HPLC con detección por fluorescencia (Afshar y cols., 2004; Härtter y cols., 1996). Además de la sencillez en la elección del tipo de detector a utilizar, está el tipo de fase móvil. Algunos métodos (Afshar y cols., 2004; Eichhold y cols., 2007; Kumar y cols., 2007) utilizan fases móviles algo más complejas que en el método aquí propuesto, que utiliza una fase móvil sencilla Buffer fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM (ajustado a pH 4.00 con ácido ortofosfórico)-acetonitrilo (60:40 v/v), Por ejemplo, en el método desarrollado por Afshar y cols. (2004), utilizan una elución por gradiente con dos tipos de fase móvil, fase móvil A compuesta por buffer dihidrógeno fosfato de potasio (pH = 3, 0.01 M):metanol:tetrahidrofurano (68.5:31:0.5) y una fase móvil B compuesta por metanol:tetrahidrofurano (93.25:6.75).

El nuevo método desarrollado es considerablemente rápido, en aproximadamente 10 minutos se obtienen los resultados. Al compararlo con los otros métodos anteriormente publicados, los que utilizan como HPLC-MS/MS obtuvieron tiempos de retención similares (Kumar y cols., 2007) o menores (Eichhold y cols., 2007; McCauley-Myers y cols., 2000). Los métodos desarrollados con una metodología HPLC con detección por fluorescencia (Afshar y cols., 2004; Härtter y cols., 1996) obtuvieron tiempos de retención algo superiores que el nuevo método aquí desarrollado. En ambos métodos se obtuvieron resultados de más de 20 minutos (Afshar y cols., 2004; Härtter y cols., 1996).

Los límites de cuantificación de los métodos que utilizan HPLC-MS/MS (Eichhold y cols., 2007; McCauley-Myers y cols., 2000; Kumar y cols. 2007) fueron menores que en el nuevo método desarrollado. También se consiguieron límites de cuantificación algo menores (5 ng/mL) en el método desarrollado por Härtter y cols. (1996). El método publicado por Afshar y cols., consiguieron obtener límites de cuantificación de 10 ng/mL para ambos analitos, al igual que se consiguió obtener en el método desarrollado en la presente Tesis para dextrometorfano, si bien este fue mayor para dextrorfano (15 ng/mL).

Sin embargo, no todos los métodos se han validado para su uso en humanos. El método publicado por Kumar y cols. (2007) fue validado en plasma de cerdo y el método desarrollado por McCauley-Myers y cols. (2000) se validó en plasma canino.

El método desarrollado en este estudio tiene como resultado la extracción y detección clara de los analitos: dextrometorfano, dextrorfano y levallorfan. Utiliza sólo un tipo de fase móvil, no bifásica, ni por gradiente como ocurre con algunos de los métodos previos. Los tiempos de retención de los analitos y el tiempo total de retención es menor de 10 minutos.



## 1.2. ESTUDIO I.2. Estudio del metabolismo de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Ecuador.

Este es el primer estudio realizado en una población ecuatoriana en la que se describe la distribución de fenotipos y genotipos de *CYP2D6*. La baja frecuencia (<1%) en individuos que fenotípicamente son PMs es consistente con la ausencia de individuos PMs descrita previamente en poblaciones amerindias, como son las poblaciones cunas (Arias y cols., 1988) y tepehuanos (Sosa-Macías y cols., 2006).

El porcentaje de PMs (0.9%) y de UMs (0%) que se encontró en la población ecuatoriana es menor con respecto a la española (Henthorn y cols., 1989; LLerena y cols., 1993). Además, la población ecuatoriana presenta un metabolismo más lento que la población española (Figura 10) y como se ha visto en otras poblaciones caucásicas. La población estudiada estaría más cercana a un comportamiento de ancestría oriental.

Si se compara el porcentaje de PMs con otras poblaciones hispanas encontramos que este fue más bajo que en poblaciones mestizas mexicanas, mexicanos americanos y uruguayos (6.8-10%, 3.2-6% y 7.3%, respectivamente) (Tabla I). En poblaciones españolas el porcentaje de PM también fue mayor que en esta población ecuatoriana (10%), así como para el resto de poblaciones europeas. Este porcentaje de PM bajo (0.9%) es similar con algunas poblaciones indígenas de América (0% en indígenas tepehuanos y 1.1% de indígenas nativos de Canadá) y con poblaciones asiáticas de China y Japón (0.6 y 1.0%, respectivamente).

En este estudio, se tomó como punto de corte un IM dextrometorfano/dextrorfano de 6.3 ( $\log_{10} \text{IM}=0.8$ ) para separar PMs de EMs, se escogió en base a la gráfica de la función probit y a la observación visual del histograma (Figura 9). Tamminga y cols. (2001) sugiere la fiabilidad de utilizar muestras de plasma recogidas a las 3 h de haber tomado el fármaco, y la antimoda que diferenciaría a los PMs de los EMs calculada fue de 2.0 (Yeh y cols., 2003).

Este estudio puede tener alguna limitación, ya que detecta sólo la fracción libre de los analitos. Aunque sólo se encontró un individuo que fenotípicamente fuese PM, este fue confirmado por el análisis del genotipo (*CYP2D6*\*4/\*4).

La frecuencia de los alelos nulos en esta población (\*3, \*4, \*5, \*6, \*4xN) fue del 14%, esta fue similar a los datos encontrados en otros estudios de otras poblaciones hispanas (11-20%), pero más altas que las halladas en mapuches de Chile (7.8%) y mexicanos tepehuanos (1.1%). Además, en estas dos últimas poblaciones, el alelo no funcional más frecuente fue el *CYP2D6*\*4 (10.6%; Tabla XXII).

La frecuencia de alelos nulos en la población ecuatoriana fue menor que las encontradas en poblaciones europeas (20.6-35.5%), en todas estas poblaciones la variante alélica no funcional más frecuente fue la variante *CYP2C9*\*4 (Tabla IV). En poblaciones norteamericanas caucásicas esta frecuencia también fue mayor que la encontrada en la población de estudio de esta Tesis. En cambio, en poblaciones afroamericanas esta frecuencia fue similar (12.9-14.3%), y menor en una población indígena de Canadá (7.5%) (Tabla IV).

La frecuencia de alelos nulos encontradas en la población ecuatoriana estudiada fue mayor que la encontrada en poblaciones africanas (0.7-7.9%) y en poblaciones asiáticas (4.5-7.5%) (Tabla IV).

**Tabla XXIII.** Porcentaje de las variantes alélicas del *CYP2D6* y de metabolizadores lentos en la población ecuatoriana (n=118) y poblaciones hispanas previamente estudiadas.

Población	N	Alelos no funcionales				Alelos actividad reducida		Multiplicaciones	Multiplicación alelos no funcionales	Multiplicación alelos funcionales	%PMs	Referencia
		*3	*4	*5	*6	*10	*17					
Brasileños-africanos	87	1.2	6.3	4.2	0	4.2	9.2		2.3	1.2		Kohlrausch y cols., 2009
Brasileños-europeos	92	0	10.3	1.1	2.2	2.7	2.2		4.9	1.6		Kohlrausch y cols., 2009
Colombianos	121	1.2	19.4	0.8	0		1.6	1.2				Isaza y cols., 2000
Cubanos-blancos	130	0	14.6	1.9	0.8	0.4	2.7		3.8	0.4		LLerena y cols., 2012
Cubanos-blancos	131									5.3 (dbq)		LLerena y cols., 2012
Cubanos-mestizos	126	0	14.3	1.6	1.2	0.8	10.2		0	4.7		LLerena y cols., 2012
Cubanos-mestizos	129									3.9 (dbq)		LLerena y cols., 2012
Cuna (Panamá)	170									0 (spt)		Arias y cols., 1989
Cuna (Panamá)	89									0 (dbq)		Jorge y cols., 1999
Embera (Panamá, Colombia)	153	0	14	0	1.1	6.9				2.2 (spt)		Jorge y cols., 1999
Españoles	925									5.2 (dbq)		LLerena y cols., 1993
Españoles	327	0.5	18.5	1.4	3.1	2.0	0		0.3	4.1		LLerena y cols., 2012
Mapuches (Chile)	84	0	3.6	4.2		1.8						Muñoz y cols., 1998
Mexicano-americanos	349	<1	10.3	2.3		7.4	<1	1				Mendoza y cols., 2001
Mexicano-americanos	285									3.2 (dxt)		Mendoza y cols., 2001
Mexicano-americanos	50		17	2		1	2	3		6 (dxt)		Casner y cols., 2005
Mexicano-americanos	264	0.2	10	1.7	0.4	2.8	0.2	0.8				Luo y cols., 2005
Mexicano-americanos	236									10 (dxt)		Luo y cols., 2005
Mexicano-mestizos	243	1.4	11.2	2.7		12.4	1.7	12.8				López y cols., 2005
Mexicano-mestizos	100									10 (dxt)		López y cols., 2005
Mexicano-mestizos	110	0.9	13.1		0	2.3						Sosa-Macías y cols., 2006
Mexicano-mestizos	88									6.8 (dxt)		Sosa-Macías y cols., 2006
Ngawbe (Panamá, Colombia)	344	0	17.1	0	0.5	17.5				4.4 (spt)		Jorge y cols., 1999
Nicaragüenses-mestizos	98	0	14.2	4.6	0	3.1	0		0	2.0		LLerena y cols., 2012
Nicaragüenses-mestizos	133									6.0 (dbq)		LLerena y cols., 2012
Tepehuanos (México)	85	0	0.6		0	0						Sosa-Macías y cols., 2006
Tepehuanos (México)	58									0 (dxt)		Sosa-Macías y cols., 2006
Uruguayos	302									7.3 (dxt)		Estévez y cols., 1997
<b>Ecuatorianos</b>	<b>118</b>	<b>0.4</b>	<b>10.6</b>	<b>2.1</b>	<b>0</b>	<b>1.3</b>	<b>0.4</b>		<b>0.8</b>	<b>0.8</b>	<b>0.9 (dxt)</b>	<b>Dorado y cols., 2012b</b>

N= número de individuos; %PM= porcentaje de metabolizadores lentos; dxt= dextrometorfano; dbq= debrisoquina; spt= esparteína

La frecuencia de duplicaciones o multiplicaciones de alelos activos de *CYP2D6* en poblaciones amerindias (0-1%) incluyendo nicaragüenses fue similar a la población ecuatoriana estudiada, pero más bajas que las reportadas para poblaciones blanca europeas (3-5%) (Tabla XXIII).

La frecuencia de los alelos con actividad reducida encontradas en este estudio (*\*10*, *\*17*, *\*29*, *\*41*) fue de un 5.1%, este resultado es similar a la encontrada en poblaciones caucásicas, pero menor que aquellas que se encontraron en poblaciones amerindias y afro-americanas (11-17.5%; Tabla XXIII). Aunque en estas poblaciones los alelos más frecuentes son *CYP2D6\*10* y *CYP2D6\*41* (1.3 y 2.2%, respectivamente, Tabla XXIII).

La frecuencia de alelos con actividad reducida fue menor a la encontrada en poblaciones afroamericanas (22.1-30%), asiáticas (20.3-64.7%) y africanas (17.6-39.6%). Pero en poblaciones asiáticas la variante alélica predominante es la variante *CYP2D6\*10*, y en poblaciones africanas es la variante *CYP2D6\*17* (Tabla IV).

A pesar de haber un 14% de alelos con ausencia de actividad, sólo el 1% de la población aproximadamente, es fenotípicamente lenta (PM), con lo que probablemente existen otros factores que influyen en la actividad de estas enzimas y no sólo el componente genético. Lo mismo ocurre con los metabolizadores ultrarrápidos, a pesar de encontrar un 2.6% de la población que genotípicamente sería ultrarrápida, no encontramos ningún individuo en esta población que fenotípicamente lo sea.

## **2. ESTUDIO II. FENOTIPO METABÓLICO DE LOSARTÁN Y GENOTIPOS *CYP2C9* EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS ECUATORIANOS RESPECTO DE LA ESPAÑOLA.**

### **2.1. ESTUDIO II.1. Desarrollo y validación de un método HPLC para el análisis de losartán en orina para su uso en estudios farmacogenéticos del *CYP2C9*.**

En este estudio se ha desarrollado un nuevo método analítico para medir simultáneamente losartán y E-3174 en orina humana.

Se han desarrollado varios métodos para determinar losartán, algunos de ellos utilizan como matriz biológica el plasma humano (Shah y cols., 2009; Yeung y cols., 2000) y otros que utilizan orina (Yasar y cols., 2002a; Ritter y cols., 1997; Farthing y cols., 1997; del Rosario Brunetto y cols., 2009; Polinko y cols., 2003; Zhang y cols., 1996). En el nuevo método desarrollado se eligió como matriz biológica orina porque es más fácil de obtener y los voluntarios no sufren ninguna intervención que para algunos de ellos podría ser incómodo, ya que la obtención de plasma requiere una extracción de sangre.

Los tiempos de retención obtenidos son similares a otros métodos publicados que utilizan una metodología HPLC con detección por fluorescencia o ultravioleta (Ritter y cols., 1997; Furtek y Lo, 1992), aunque es menor que en un método HPLC-MS/MS (Polinko y cols., 2003).

La sensibilidad obtenida con este método es mayor si se compara con publicaciones previas (Yasar y cols., 2002a; Farthing y cols., 1997; del Rosario Brunetto y cols., 2009; Furtek y Lo, 1992; Zhang y cols., 2006) en los que el límite de cuantificación se encuentran entre los 10-20 ng/mL para losartán y E-3174, mientras que se obtiene un límite de cuantificación con el método propuesto en esta Tesis de 2 y 5 ng/mL, respectivamente.

Se ha conseguido buenos niveles de precisión (5.9% y 7.5% de CV para losartán y E-3174, respectivamente) y exactitud (94.4±5.6% y 101.3±7.6% para losartán y E-3174, respectivamente) para este método analítico. En cuanto a los valores de los porcentajes de recuperación en la extracción líquido-líquido de losartán y su metabolito están entre el 88.2% y el 105%, los cuales no sólo son similares a las recuperaciones obtenidas en otros

procedimientos de extracción líquido-líquido llevadas a cabo previamente (Polinko y cols., 2003; Ritter y cols., 1997), sino que también se ha logrado mejorar la recuperación que se obtuvo utilizando una extracción en fase sólida (Iwasa y cols., 1999). Así, el procedimiento de extracción líquido-líquido que se ha utilizado en el método desarrollado representa una forma de extracción sencilla y rápida que consigue eliminar interferencias que se puedan encontrar en la matriz y además conseguir una extracción eficiente de los analitos a analizar. Aparte de esto, este método emplea un equipamiento utilizado en muchos laboratorios clínicos de rutina.

El método desarrollado en este estudio tiene como resultado la separación clara de una forma sencilla de los analitos: losartán y E-3174. Se obtuvo una sensibilidad menor que en otros métodos publicados anteriormente, con niveles de recuperación satisfactorios. Además, este método se ha usado para evaluar la relación entre el IM losartán/E-3174 y genotipo *CYP2C9* encontrando diferencias significativas, los cuales se ajustan con los datos publicados anteriormente (Yasar y cols., 2002a).

## **2.2. ESTUDIO II.2. Estudio del metabolismo de losartán y genotipos CYP2C9 en una población de voluntarios sanos de Ecuador.**

Hasta la fecha, este es el primer estudio en una población ecuatoriana en el que se ha realizado análisis del fenotipo metabólico y del genotipo *CYP2C9* utilizando losartán como fármaco test en orina (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004). Además, hasta la fecha, es la población más grande donde se ha evaluado el fenotipo metabólico del *CYP2C9* utilizando losartán como fármaco test.

La media del IM losartán/E-3174 en esta población fue más alta ( $p < 0.05$ ) que en las poblaciones previamente publicadas de origen turco (Babaoglu y cols., 2004) y suecos (Sandberg y cols., 2004) y el panel de españoles analizado en el Estudio II.1 (Tabla XXIV). Se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos *CYP2C9*\*1/\*1 de la población sueca (Sandberg y cols., 2004) y la ecuatoriana del presente estudio. Sin embargo, estas diferencias no pueden ser relacionadas con la presencia de metabolizadores lentos, ya que no se encontró ningún metabolizador lento fenotípicamente o genotípicamente hablando. La influencia genotípica no está todavía totalmente explicada probablemente sea debido a la gran variabilidad en los sujetos que se encuentran dentro del grupo con genotipo *CYP2C9*\*1/\*1. La explicación de esta variabilidad aún permanece sin aclarar. Por lo tanto, estas diferencias pueden ser debidas a factores ambientales, tipos de alimentos y/o variantes alélicas de *CYP2C9* desconocidas que potencialmente podrían estar relacionadas con la disminución de la actividad enzimática, estas podrían ser las razones ya que esta población tiene un componente de ascendencia andina que no ha sido descrita previamente.

**Tabla XXIV.** Genotipos de *CYP2C9* e IM losartán/E-3174 (0-8 horas) en diferentes poblaciones en comparación con la población de Ecuador del presente estudio.

Genotipo <i>CYP2C9</i>	Suecos (Sandberg y cols., 2004)			Españoles (panel Estudio II.1)			Ecuatorianos			Turcos (Babaoglu y cols., 2004) †			Ecuatorianos		
	N	Media	±DS	N	Media	±DS	N	Media	±DS	N	Mediana	Rango	N	Mediana	Rango
<i>CYP2C9</i> *1/*1	81	0.9 **	1.7	7	1.2	0.4	167	4.9	7.0	58	0.7	0.23-28.60	167	2.5	0.13-39.8
<i>CYP2C9</i> *1/*2	19	1.2 *	1.8	2	1.6	0.5	21	7.9	12.4	10	0.9	0.30-1.63	21	2.3	0.08-52.67
<i>CYP2C9</i> *1/*3	20	2.3	2.1	2	1.7	0.3	6	12.4	13.8	12	2.4	0.75-6.26	6	5.2	1.93-35.27
<i>CYP2C9</i> *2/*2	2	0.5; 3.4 †	--	0	--	--	0	--	--	3	1.5	1.40-3.81	0	--	--
<i>CYP2C9</i> *2/*3	2	2.6;3.4 †	--	0	--	--	0	--	--	1	3.9	--	0	--	--
<i>CYP2C9</i> *3/*3	2	20;200 †	--	2	38.71	--	0	--	--	1	160.7	--	0	--	--

N= número de individuos; DS= desviación estándar; \*p < 0.05 comparado (test t de Student) con el grupo \*1/\*2 del presente estudio. \*\*p < 0.0001 comparado (test t de Student) con el grupo \*1/\*1 del presente estudio. †Las medianas de los grupos de genotipo en la población ecuatoriana fueron 2.1-3.5 veces más alto que en la población turca. ‡ El valor original de cada uno de los dos casos que se presentaron.

La Figura 16 muestra una actualización de las frecuencias alélicas para *CYP2C9*\*2 y \*3 en diferentes poblaciones de voluntarios sanos. Como previamente se describió para mexicanos americanos y mestizos (0.08 y 0.07, respectivamente; Llerena y cols., 2004; Dorado y cols., 2011), negros brasileños y mestizos brasileños (0.04 y 0.07, respectivamente; Vianna-Jorge y cols., 2004) y bolivianos (0.05; Bravo-Villalta y cols., 2005) (Tabla VIII) la frecuencia del alelo *CYP2C9*\*2 fue similar a la población ecuatoriana (0.054). Sin embargo, esta frecuencia fue más baja ( $p < 0.05$ ) entre la población ecuatoriana estudiada (0.054) y la población española (0.16; Dorado y cols., 2011) (Figura 16).

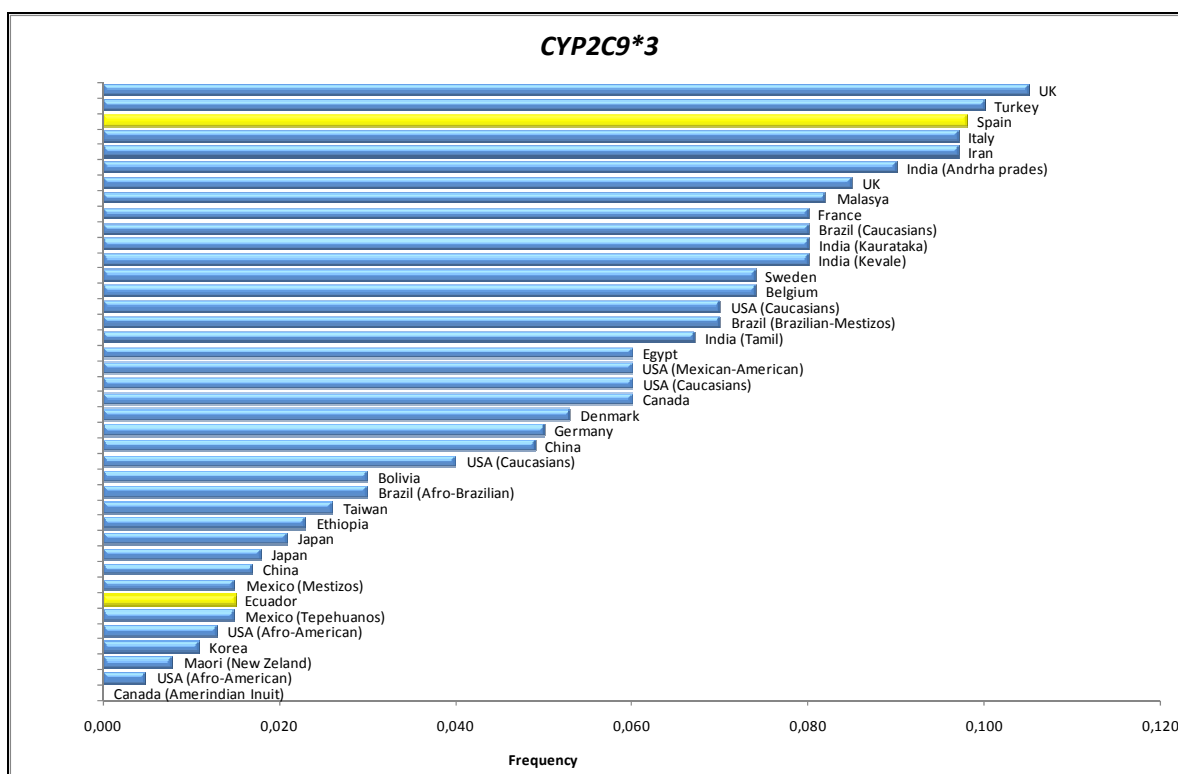
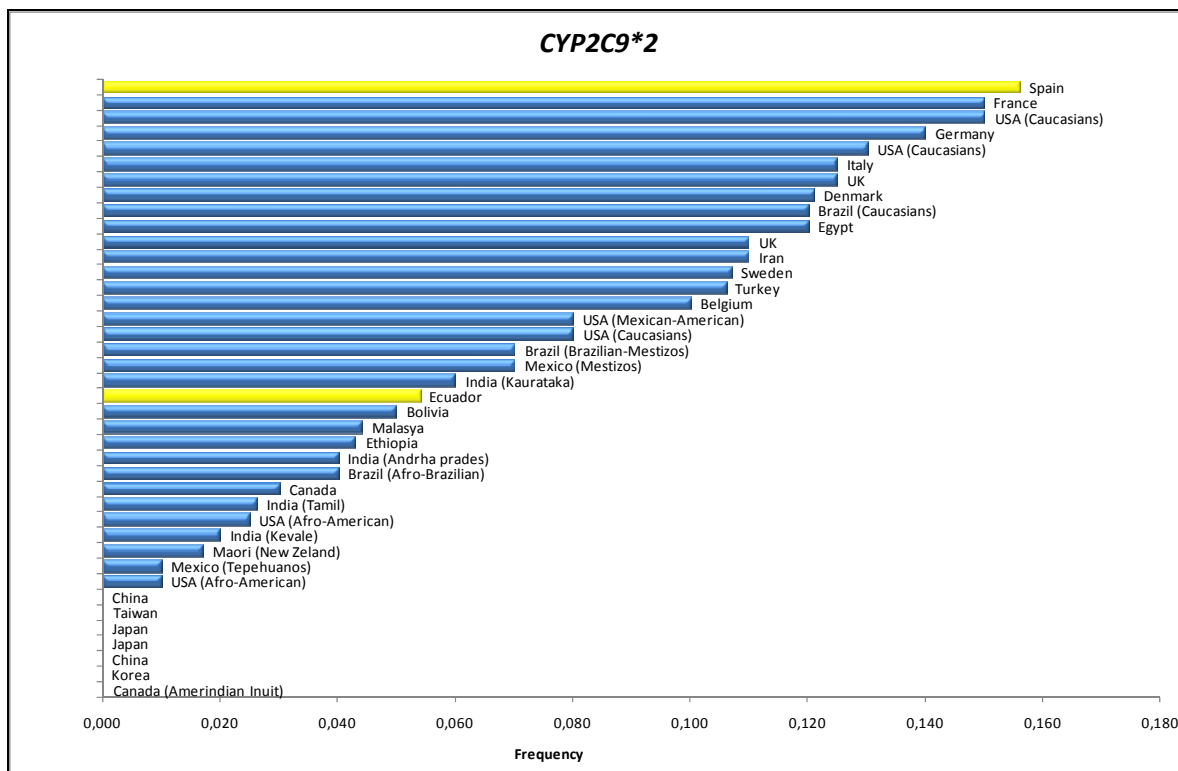
Además, la frecuencia del alelo *CYP2C9*\*3 en nuestra población estudiada (0.015) fue más baja ( $p < 0.05$ ) que en una población mexicano americana (0.06; Llerena y cols., 2004), blancas brasileña y mestiza brasileña (0.08 y 0.07, respectivamente; Vianna-Jorge y cols., 2004) y española (0.08; Dorado y cols., 2011) (Figura 16).

En esta población mestiza ecuatoriana, las frecuencias para estas dos variantes fueron 0.054 y 0.015 para la variante *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3, respectivamente. Estas fueron similares a las que presentaron otras poblaciones hispanas estudiadas, pero diferentes a las que presentaron españoles y caucásicos brasileños (Figura 16). Mexicanos (americanos, mestizos y tepehuanos) y bolivianos presentaron unas frecuencias en el rango de 0.01-0.08 para



*CYP2C9*\*2 y 0.02-0.06 para *CYP2C9*\*3 (Figura 16). La baja frecuencia del alelo *CYP2C9*\*2 sugiere una relación con la ancestría oriental, al igual que ocurre con resultados en nuestros estudios previos de poblaciones mexicanas (Llerena y cols., 2004; Dorado y cols., 2011). Sin embargo, la frecuencia del alelo *CYP2C9*\*3 fue más baja si se compara con los resultados previamente publicados de blancos europeos y mexicanos americanos, pero similares a los africanos americanos (Figura 16). Finalmente, los datos actuales y nuestros resultados anteriores también nos permiten plantear la hipótesis de que existe una carencia o una muy baja presencia de las variantes alélicas *CYP2C9* \*4, \*5 y \*6 entre los hispanos.

**Figura 16.** Frecuencias alélicas para *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* en diferentes poblaciones previamente publicadas (Sánchez-Diz y cols., 2009; Xie y cols., 2002; LLerena y cols., 2004; Dorado y cols., 2007; 2011). Las barras en amarillo corresponden a la población ecuatoriana del presente estudio y la población española.



Aproximadamente encontramos que un 14% de la población ecuatoriana porta alelos defectuosos para este gen, en cambio en la población española este porcentaje es mayor. Las diferencias que observamos en estas poblaciones entre estos grupos genotípicos de *CYP2C9* son probablemente debidos a factores ambientales y/o factores genéticos que pueden influir en la variabilidad de la actividad *CYP2C9*.

Los IM entre los diferentes genotipos *CYP2C9* se encuentran en la línea con los resultados previos en los que este IM losartán/E-3174 es más bajo en los individuos con la variante alélica *CYP2C9\*1* que entre individuos que portan la variante *CYP2C9\*3* (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004).

Por otro lado, no se encontró una asociación entre el consumo de tabaco o alcohol en estas poblaciones y el IM de losartán/E-3174; sin embargo, se han encontrado diferencias entre hombre y mujeres. Estas diferencias no se han encontrado en otras poblaciones previamente estudiadas (Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004), aunque se ha encontrado que mujeres que estaban tomando anticonceptivos orales presentaron un IM losartán/E-3174 más bajo que mujeres que no estaban tomando anticonceptivos orales (Sandberg y cols., 2004). Por otra parte, se ha encontrado que *in vitro* el etinilestradiol y la medroxyprogesterona inhiben-dependientemente el metabolismo de fármacos metabolizados por *CYP2C9* en microsomas de hígado (Laine y cols., 2003). En un estudio reciente (Mwinyi y cols., 2011) se ha establecido la asociación del receptor de estrógeno  $\alpha$  ( $E\alpha$ ) con el promotor del *CYP2C9 in vitro*. En este estudio también se publicó la influencia del  $17\alpha$ -etinilestradiol (un ligando de  $E\alpha$ ) en la inhibición de la expresión de *CYP2C9* (Mwinyi y cols., 2011). Los análisis de PCR cuantitativas revelan que los niveles de mRNA de *CYP2C9* fueron significativamente suprimidos por  $17\alpha$ -etinilestradiol y  $17\beta$ -etinilestradiol (Mwinyi y cols., 2011). Este estudio demostró que  $E\alpha$ , después de ser activado por  $17\beta$ -etinilestradiol y  $17\alpha$ -etinilestradiol fue capaz de modular la actividad del promotor de *CYP2C9* al encontrarse un nuevo sitio de unión de  $E\alpha$  en la posición -149/-145 (Mwinyi y cols., 2011).

En el presente estudio no se recogió información acerca de si las mujeres estaban tomando anticonceptivos orales, ya que esto no fue el propósito del estudio. En futuros estudios, sin embargo, podría ser un factor a estudiar. Además, en estudios futuros en poblaciones

ecuatorianas se deberían incluir variantes alélicas que han demostrado estar relacionadas con una actividad reducida de CYP2C9 (como *CYP2C9\*8*).

Las diferencias de comportamiento se pueden explicar en parte a través del genotipo del individuo o de una población en global. Por ejemplo, se sabe que el CYP2C9 participa en el metabolismo de fenitoína, y se ha demostrado que altos niveles de este fármaco se asocian con dos variantes de este gen: *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* (López y cols., 2011). Además también se ha visto que las mayores concentraciones de fenitoína se asocian con la variante *CYP2C9\*3*. Por lo que para mejorar el uso de este fármaco, y de otros fármacos en los que se ha demostrado la influencia del genotipo, sería interesante estudiar la farmacogenética de estas variantes en individuos tratados con él.

La Farmacogenética permitirá una individualización de los fármacos y también el desarrollo de recomendaciones de dosis de fármacos acorde al grupo étnico y factores culturales. Muchos estudios han demostrado que las diferencias genéticas entre individuos son altas entre aquellos grupos de diferentes etnias o razas (Suarez-Kurtz y Pena, 2006). Por lo tanto, individualizar el tratamiento que se le da a un paciente, el mejor enfoque sería considerar al individuo como parte de un grupo étnico.

Sin embargo, en términos de salud pública, la farmacogenética de poblaciones podría ser utilizada para la optimización de las dosis recomendadas de fármacos para cada uno de los grupos étnicos, con el objetivo de prevenir efectos adversos o fallos terapéuticos.

## VI. CONCLUSIONES

Página

---

<b>1. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>113</b>
<b>2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....</b>	<b>113</b>

---

## 1. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de la presente Tesis indican la existencia de variabilidad interindividual en los fenotipos metabólicos de dextrometorfano y losartán, en los polimorfismos de los genes *CYP2D6* y *CYP2C9*, y la influencia de estos en el fenotipo metabólico en una población de voluntarios sanos mestiza de Ecuador. Se han encontrado diferencias entre la población ecuatoriana y la española.

Estos resultados apoyan la variabilidad interétnica en el metabolismo de fármacos mediados por enzimas de gran relevancia clínica (*CYP2D6*, *CYP2C9*) en las poblaciones en general y en las hispanas en particular.

## 2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

### 2.1. ESTUDIO I. Fenotipo metabólico de dextrometorfano y genotipos *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.

I.1. Se desarrolló un método analítico para la determinación de dextrometorfano y dextrorfano en plasma que resultó ser preciso, exacto, reproducible y adecuado para su uso en estudios de fenotipación en humanos.

I.2. Existe gran variabilidad interindividual en el metabolismo de dextrometorfano en la población de voluntarios sanos mestiza de Ecuador. Existen diferencias en el fenotipo metabólico de dextrometorfano entre la población ecuatoriana y la española. En Ecuador el porcentaje de PMs es mucho menor que en España (0.9%/10%). En el resto de la población (EMs), la capacidad metabólica evaluada (*CYP2D6*) en la población ecuatoriana está disminuida en comparación con la española. Adicionalmente, no se han descrito UMs en Ecuador, cuya frecuencia es elevada en la población española.

I.3. En la población de voluntarios sanos mestiza de Ecuador la frecuencia de alelos con actividad reducida del *CYP2D6* fue mayor que en la población española. La frecuencia de las variantes nulas y multiplicaciones fue menor que en la población española. Existen

diferencias interétnicas en las frecuencias alélicas del *CYP2D6* en la población mestiza del Ecuador respecto de la población española y con respecto a otras poblaciones estudiadas.

I.4. No se ha encontrado ninguna influencia entre el género, edad, consumo de tabaco y cafeína en el fenotipo metabólico de dextrometorfano en una población mestiza de Ecuador. Existe una influencia del genotipo *CYP2D6* en el fenotipo metabólico de dextrometorfano aunque no es descartable la influencia de otros factores.

## **2.2. ESTUDIO II. Fenotipo metabólico de losartán y genotipos *CYP2C9* en una población de voluntarios sanos ecuatorianos respecto de la española.**

II.1. Se desarrolló un método analítico para la determinación de losartán y su metabolito E-3174 en orina que demostró ser preciso, exacto, reproducible y adecuado para su uso en estudios de fenotipación en humanos.

II.2. Existe una gran variabilidad interindividual en el índice metabólico de losartán/E-3174 en una población de voluntarios sanos mestizos de Ecuador. No se observaron PMs ni UMs para el metabolismo de losartán en la población ecuatoriana mestiza al igual que en la española. La capacidad metabólica evaluada (*CYP2C9*) fue menor en la población mestiza ecuatoriana que en otras poblaciones.

II.3. La frecuencia de los alelos *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* fue más baja en la población mestiza ecuatoriana que en la población española. Existen diferencias interétnicas en las frecuencias alélicas del *CYP2C9* en la población mestiza de Ecuador respecto de la población española y con respecto a otras poblaciones estudiadas.

II.4. Se ha demostrado la influencia del género en el metabolismo de losartán, pero no la de los hábitos de consumo de alcohol, tabaco o cafeína en la población mestiza ecuatoriana. Existe una influencia no solo los genotipos *CYP2C9*, sino también de otros factores (género) en la población mestiza ecuatoriana respecto de la española.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham BK, Adithan C, Kiran PU, Asad M, Koumaravelou K. Genetic polymorphism of CYP2D6 in Karnataka and Andhra Pradesh population in India. *Acta Pharmacol Sin.* 2000b;21:494-8.
- Abraham BK, Adithan C, Mohanasundaram J, Shashindran CH, Koumaravelou K, Asad M. Genetic polymorphism of CYP2D6 in Tamil population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;56:849-50.
- Abraham BK, Adithan C, Shashindran CH, Vasu S, Alekutty NA. Genetic polymorphism of CYP2D6 in a Keralite (South India) population. *Br J Clin Pharmacol.* 2000a;49:283-8.
- Adithan C, Gerard N, Vasu S, Balakrishnan R, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. Allele and genotype frequency of CYP2C9 in Tamilnadu population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59:707-9.
- Afshar M, Rouini M, Ala S. Dextromethorphan metabolic phenotyping in an Iranian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;60:849-54.
- Afshar M, Rouini MR, Amini M. Simple chromatography method for simultaneous determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;802:317-22.
- Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Prevalence of CYP2C9 variants in the Mexican population. *Arch Med Res.* 2008;39:463.
- Agúndez JA, Martínez C, Ledesma MC, Ledona MG, Ladero JM, Benitez J. Genetic basis for differences in debrisoquine polymorphism between Spanish and other white population. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;55:412-7.
- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P-450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet.* 1999;353:717-9.
- Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278:441-6.
- Alvan G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990;39:533-7.
- Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56:653-7.
- Arias TD, Jorge LF. An observation on the ethnic uniqueness of the debrisoquine and sparteine antimodes: a study in the Ngawbé Guaymí Amerindians of Panamá. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;28:493-4.
- Arias TD, Jorge LF, Lee D, Barrantes R, Inaba T. The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama: absence of evidence for deficient metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 1988;43:456-65.
- Armstrong M, Fairbrother K, Idle JR, Daly AK. The cytochrome P450 CYP2D6 allelic variant CYP2D6J and related polymorphisms in a European population. *Pharmacogenetics.* 1994;4:73-81.
- Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, Nacak M, Roots I. Frequency of cytochrome P-450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48:409-15.



- Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, Eliasson E, Dahl ML, Kayaalp SO, Bozkurt A. CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004;60:337-42.
- Bae JW, Kim HK, Kim JH, Yang SI, Kim MJ, Jang CG, Park YS, Lee SY. Allele and genotype frequencies of CYP2C9 in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;60:418-22.
- Beech E, Mathur SV, Harrold BP. Phenytoin toxicity produced by tolbutamide. *BMJ.* 1988;297:1613-4.
- Berez R. The pharmacogenetics of antipsychotic drugs: clinical implication in psychiatric patients. Tesis Doctoral. 2001. Universidad de Debrecen (Hungria)
- 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.
- Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Aberg-Wistedt A, Humble M, Johansson I, Lundqvist E, Ingelman-Sundberg M. Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet.* 1993a;341:63.
- Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29:192-207.
- Bertilsson L, Lou QY, Du YL, Liu Y, Kuang TY, Liao XM, Wang KY, Reviriego J, Iselius L, Sjöqvist F. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquine and *s*-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;51:388-97.
- Bloch A, Ben-Chetrit E, Muszkat M, Caraco Y. Major bleeding caused by warfarin in a genetically susceptible patient. *Pharmacotherapy.* 2002;22:97-101.
- Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Llorca MA. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005;106:135-40.
- Bort R, Mace K, Boobis A, Gomez-Lechon MJ, Pfeifer A, Castell J. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:787-96.
- Bozina N, Granić P, Lalić Z, Tramišak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J.* 2003;44:425-8.
- Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics.* 2002;3:229-43.
- Bradford LD, Gaedigk A, Leeder JS. High frequency of CYP2D6 poor and "intermediate" metabolizers in black populations: a review and preliminary data. *Psychopharmacol Bull.* 1998;34:797-804.
- Brandolese R, Scordo MG, Spina E, Gusella M, Padriani R. Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9\*3. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:391-4.
- Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R. Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61:179-84.
- Burian M, Grösch S, Tegeder I, Geisslinger G. Validation of a new fluorogenic real-time PCR assay for detection of CYP2C9 allelic variants and CYP2C9 allelic distribution in a German population. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;54:518-21.
- Caraco Y, Muszkat M, Wood AJ. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of CYP2C9 activity in vivo. *Pharmacogenetics.* 2001;11:587-96.

- Casner PR. The effect of CYP2D6 polymorphisms on dextromethorphan metabolism in Mexican Americans. *J Clin Pharmacol*. 2005;45:1230-5.
- Cholerton S, Daly AK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P-450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:434-9.
- Chou WH, Yan FX, Robbins-Weilert DK, Ryder TB, Liu WW, Perbost C, Fairchild M, de Leon J, Koch WH, Wedlund PJ. Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. *Clin Chem*. 2003;49:542-51.
- Christensen M, Andersson K, Dalén P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, Tybring G, Wahlberg A, Yasar U, Bertilsson L. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:517-28.
- Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9\*2 allele alters interaction of the cytochrome P-450 with NADPH:cytochrome P-450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics*. 1997;7:203-10.
- Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcin*. 1991;12:1197-201.
- Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995a;274:516-20.
- Dahl ML, Yue QY, Roh HK, Johansson I, Sawe J, Sjöqvist F, Bertilsson L. Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*. 1995b;5:159-64.
- Daly AK, Armstrong M, Idle JR. Molecular genotyping to predict debrisoquine hydroxylation phenotype. *Lancet*. 1990;336:889-90.
- Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Sayi J, Kaaya S, Sommers DK, Snyman JR, Hasler JA. Genetic polymorphism of CYP2D6 and CYP2C19 in east- and southern African populations including psychiatric patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57:11-7.
- Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33:184-213.
- del Rosario Brunetto M, Contreras Y, Clavijo S, Torres D, Delgado Y, Ovalles F, Ayala C, Galignani M, Estela JM, Martin VC. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50:194-99.
- De Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;253:387-94.
- Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, Wilkinson GR, Schwarz UI. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9\*5) expressed among African-Americans. *Mol Pharmacol*. 2001;60:382-7.
- Dorado P. Estudio del citocromo CYP2C9 en la población española: implicación en el metabolismo de fármacos en voluntarios sanos y en pacientes psiquiátricos. Tesis Doctoral 2003. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.
- Dorado P, Berecz R, Cáceres MC, González I, Llerena A. Reproducibility over time of the urinary diclofenac/4'-OH diclofenac ratio among different CYP2C9 genotypes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2003b;28:213-5.

- Dorado P, Berez R, Cáceres MC, Llerena A. Analysis of diclofenac and its metabolites by high-performance liquid chromatography: relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003a;789:437-42.
- Dorado P, Berez R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, Llerena A. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003c;59:221-5.
- Dorado P, Cáceres MC, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J, Llerena A. Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques.* 2005;39:571-4.
- Dorado P, Cavaco I, Cáceres MC, Piedade R, Ribeiro V, Llerena A. Relationship between CYP2C8 genotypes and diclofenac 5-hydroxylation in healthy Spanish volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64:967-70.
- Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012b;68:637-44.
- Dorado P, López-Torres E, Peñas-Lledó EM, Martínez-Antón J, Llerena A. Neurological toxicity after phenytoin infusion in a pediatric patient with epilepsy: influence of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB1 genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 2012a May 29. doi: 10.1038/tpj.2012.19.
- Dorado P, Sosa-Macias MG, Peñas-Lledó EM, Alanis-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, Lares-Asseff I, Llerena A. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J.* 2011;11:108-12.
- Dorado P, Suarez-Kurtz G, Llerena A. Pharmacogenetics of cytochrome P450 in Hispanic populations. En el Capítulo 5 de Suarez-Kurtz G. *Pharmacogenomics in admixed populations.* Instituto Nacional del Cancer. Landes Bioscience. Río de Janeiro, Brasil. 2007. 222 pág.
- Duche JC, Querol-Ferrer V, Barre J, Mesangeau M, Tillement JP. Dextromethorphan O-demethylation and dextrorphan glucuronidation in a French population. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1993;31:392-8.
- Eichelbaum M. [Genetic polymorphism of drug metabolism: therapeutic implications]. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb.* 1985;122:9-10.
- Eichelbaum M. Genetic polymorphism of sparteine-debrisoquine oxidation. *ISI Atlas of Science.* 1988;243-51.
- Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osikowska-Evers BO, Tieves G, Zekorn C, Rittner C. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;23:455-58.
- Eichelbaum M, Bertilsson L, Sawe J, Zekorn C. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther.* 1982;31:184-86.
- Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119-37.
- Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979;16:183-7.
- Eichhold TH, McCauley-Myers DL, Khambe DA, Thompson GA, Hoke SH 2nd. Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrorphan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43:586-600.
- Endrizzi K, Fisher J, Klein K, Schwab M, Nüssler AC, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger UM.

- Discriminative quantification of CYP2D6 and CYP2D7/8 pseudogene mRNA by Taq-Man real-time reverse transcriptase-PCR in human liver. *Anal Biochem.* 2002;300:121-31.
- Estévez F, Giusti M, Parrillo S, Oxandabarat J. Enzyme polymorphism on the metabolic O-demethylation of dextromethorphan in a South American population. *Medicina (B Aires).* 1996;56:378-82.
- Estévez F, Giusti M, Parrillo S, Oxandabarat J. Dextromethorphan O-demethylation polymorphism in the Uruguayan population. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;52:417-8.
- Evans DA, Harmer D, Downham DY, Whibley EJ, Idle JR, Ritchie J, Smith RL. The genetic control of sparteine and debrisoquine metabolism in man with new methods of analysing bimodal distributions. *J Med Genet.* 1983;20:321-29.
- Evans DA, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J Med Genet.* 1980;17:102-5.
- Evans WE, Relling MV. Concordance of P450 2D6 (debrisoquine hydroxylase) phenotype and genotype: inability of dextromethorphan metabolic ratio to discriminate reliably heterozygous and homozygous extensive metabolizers. *Pharmacogenetics.* 1991;1:143-8.
- Evans WE, Relling MV, Rahman A, McLeod HL, Scott EP, Lin JS. Genetic basis for a lower prevalence of deficient CYP2D6 oxidative drug metabolism phenotypes in black Americans. *J Clin Invest.* 1993;91:2150-4.
- Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TW. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;704:374-8.
- Fisher AA, Le Couteur DG. Intracerebral hemorrhage following possible interaction between celecoxib and clopidogrel. *Ann Pharmacother.* 2001;35:1567-9.
- Fischer TL, Pieper JA, Graff DW, Rodgers JE, Fischer JD, Parnell KJ, Goldstein JA, Greenwood R, Patterson JH. Evaluation of potential losartan-phenytoin drug interactions in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:238-46.
- Fortuny J, Kogevinas M, Garcia-Closas M, Real FX, Tardón A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Lloreta J, Rothman N, Villanueva C, Dosemeci M, Malats N, Silverman D. Use of analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, genetic predisposition, and bladder cancer risk in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1696-702.
- Funck-Brentano C, Boelle PY, Verstuyft C, Bornert C, Becquemont L, Poirier JM. Measurement of CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo with dextromethorphan: sources of variability and predictors of adverse effects in 419 healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61:821-9.
- Funck-Brentano C, Thomas G, Jacqz-Aigrain E, Poirier JM, Simon T, Bereziat G, Jaillon P. Polymorphism of dextromethorphan metabolism: Relationship between phenotype, genotype, and response to the administration of encainide in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:780-6.
- Furtek CI, Lo MW. Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1992;573:295-301.
- Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics.* 1995;5:389-92.

- Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1991;48:943-50.
- Gaedigk A, Bhatena A, Ndjountche L, Pearce RE, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Bradford LD, Rogan PK, Leeder JS. Identification and characterization of novel sequence variations in the cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene in African Americans. *Pharmacogenomics J.* 2005;5:173-82.
- Gaedigk A, Bradford LD, Marcucci KA, Leeder JS. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:76-89.
- Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P-4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;79:841-7.
- Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics.* 1999;9:669-82.
- Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:234-42.
- Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59:303-12.
- García-Barceló M, Chow LY, Lam KL, Chiu HF, Wing YK, Waye MM. Occurrence of CYP2D6 gene duplication in Hong Kong Chinese. *Clin Chem.* 2000;46:1411-3.
- García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, Gamito FJ, Agúndez JA. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57:47-9.
- Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 2002 4;277:209-17.
- Gervasini G, Martínez C, Agúndez JA, García-Gamito FJ, Benítez J. Inhibition of cytochrome P450 2C9 activity in vitro by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. *Pharmacogenetics.* 2001;11:29-37.
- Gilbar PJ, Brodribb TR. Phenytoin and fluorouracil interaction. *Ann Pharmacother.* 2001;35:1367-70.
- Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *J Clin Pharmacol.* 2001;52:349-55.
- Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics.* 1994;4:285-99.
- González FJ. Human cytochromes P-450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:346-52.
- González FJ, Meyer UA. Molecular genetics of the debrisoquine-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;50:233-8.
- González 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.
- González FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA. Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics.* 1988a;2:174-9.

- González I. Farmacogenética del CYP2D6 en una población cubana. Tesis Doctoral. 2006. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.
- Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem*. 1992;267:83-90.
- Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics*. 1999;9:715-23.
- Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*. 1998;8:15-26.
- Guengerich FP, Gillam EM, Ohmori S, Sandhu P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M. Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology*. 1993;82:21-37.
- Guttendorf RJ, Britto M, Blouin RA, Foster TS, John W, Pittman KA, Wedlund PJ. Rapid screening for polymorphisms in dextromethorphan and mephenytoin metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1990;29:373-80.
- Hägg S, Spigset O, Dahlqvist R. Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;51:169-73.
- Halling J, Petersen MS, Damkier P, Nielsen F, Grandjean P, Weihe P, Lundgren S, Lundblad MS, Brosen K. Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61:491-7.
- Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P-450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53:596-603.
- Härtter S, Baier D, Dingemans J, Ziegler G, Hiemke C. Automated determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and column switching. *Ther Drug Monit*. 1996;18:297-303.
- Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P-450. *Mol Aspects Med*. 1999;20:12-137.
- Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevilla J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med*. 1999;20:5-20.
- Hatta FH, Teh LK, Helldén A, Hellgren KE, Roh HK, Salleh MZ, Aklillu E, Bertilsson L. Search for the molecular basis of ultra-rapid CYP2C9-catalysed metabolism: relationship between SNP IVS8-109A>T and the losartan metabolism phenotype in Swedes. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012. En prensa
- He N, Daniel HI, Hajiloo L, Shockley D. Dextromethorphan O-demethylation polymorphism in an African-American population. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55:457-9.
- Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet*. 1990;336:529-32.
- Heim MH, Meyer UA. Genetic polymorphism of debrisoquine oxidation: restriction fragment analysis and allele-specific amplification of mutant alleles of CYP2D6. *Methods Enzymol*. 1991;206:173-83.
- Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*. 1992;14:49-58.

- Helldén A, Bergman U, Engström Hellgren K, Masquelier M, Nilsson Remahl I, Odar-Cederlöf I, Ramsjö M, Bertilsson L. Fluconazole-induced intoxication with phenytoin in a patient with ultra-high activity of CYP2C9. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:791-5.
- Henthorn TK, Benitez J, Avram MJ, Martinez C, Llerena A, Cobaleda J, Krejcie TC, Gibbons RD. Assessment of the debrisoquin and dextromethorphan phenotyping tests by gaussian mixture distributions analysis. *Clin Pharmacol Ther*. 1989;45:328-33.
- Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E. Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*. 2000;8:1072-7.
- Hildebrand M, Seifert W, Reichenberger A. Determination of dextromethorphan metabolizer phenotype in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989;36:315-8.
- Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS. Alternative splicing of CYP2D mRNA in human breast tissue. *Arch Biochem Biophys*. 1997;343:101-8.
- Ieiri I, Tainaka H, Morita T, Hadama A, Mamiya K, Hayashibara M, Ninomiya H, Ohmori S, Kitada M, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit*. 2000;22:237-44.
- Imai J, Ieiri I, Mamiya K, Miyahara S, Furuumi H, Nanba E, Yamane M, Fukumaki Y, Ninomiya H, Tashiro N, Otsubo K, Higuchi S. Polymorphism of the cytochrome P-450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*. 2000;10:85-9.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007;116(3):496-526.
- Isaza CA, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2000;22:695-705.
- Iwasa T, Takano T, Hara K, Kamei T. Method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP-3174, in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;734:325-30.
- Jackson PR, Tucker GT, Lennard MS, Woods HF. Polymorphic drug oxidation: pharmacokinetic basis and comparison of experimental indices. *Br J Clin Pharmacol*. 1986;22:541-50.
- Jacqz E, Dulac H, Mathieu H. Phenotyping polymorphic drug metabolism in the French Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;35:167-71.
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:11825-9.
- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P-4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*. 1994;46:452-9.
- Jordan RA, Woolf TF. Basic concepts in drug metabolism: Part II. *J Clin Pharmacol*. 1987;27:87-90.
- Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*. 1999;9:217-28.

- Jurima-Romet M, Foster BC, Casley WL, Rode A, Vloshinsky P, Huang HS, Geertsen S. CYP2D6-related oxidation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997;75:165-72.
- Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*. 1990;265:17209-14.
- Kalow W. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. New York: Pergamon Press; 1992.
- Kaukonen KM, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Fluconazole but not itraconazole decreases the metabolism of losartan to E-3174. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998;53:445-9.
- Kazierad DJ, Martin DE, Blum RA, Tenero DM, Ilson B, Boike SC, Etheredge R, Jorkasky DK. Effect of fluconazole on the pharmacokinetics of eprosartan and losartan in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62(4):417-25.
- Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics*. 2001;11:803-8.
- Kimura M, Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Higuchi S. Genetic polymorphism of cytochrome P-450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit*. 1998;20:243-7.
- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989;45:889-904.
- Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999;13:289-95.
- 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.
- Kolocouri F, Dotsikas Y, Apostolou C, Kousoulos C, Loukas YL. Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387:593-601.
- Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Gesteira A, Barros F, Carracedo A, Hutz MH. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics*. 2009;10:1457-66.
- Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H, Chiba K. Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50:31-4.
- Kuhlenbeck DL, Eichhold TH, Hoke SH 2nd, Baker TR, Mensen R, Wehmeyer KR. On-line solid phase extraction using the Prospekt-2 coupled with a liquid chromatography/tandem mass spectrometer for the determination of dextromethorphan, dextrorphan and guaifenesin in human plasma. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 2005;11:199-208.
- Kumar V, Brundage RC, Oetting WS, Leppik IE, Tracy TS. Differential genotype dependent inhibition of CYP2C9 in humans. *Drug Metab Dispos*. 2008;36:1242-8.
- Kumar A, Mann HJ, Rimmel RP. Simultaneous analysis of cytochrome P450 probes-dextromethorphan, flurbiprofen and midazolam and their major metabolites by HPLC-mass-spectrometry/fluorescence after single-step extraction from plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;853:287-93.



- Laine K, Yasar U, Widén J, Tybring G. A screening study on the liability of eight different female sex steroids to inhibit CYP2C9, 2C19 and 3A4 activities in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*. 2003;93(2):77-81.
- Lamba V, Lamba JK, Dilawari JB, Kohli KK. Genetic polymorphism of CYP2D6 in North Indian subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998;54:787-91.
- Lane HY, Deng HC, Huang SM, Hu WH, Chang WH, Oliver YPH. Low frequency of dextromethorphan O-demethylation deficiency in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:696-7.
- Lares-Asseff I, Sosa-Macias M, Elizondo-Azuela G, Flores-Perez C, Flores-Perez J, Bradley-Alvarez F. Phenotypical expression of CYP2D6 in amerindians of tepehuano origin from Durango, Mexico. *Proc West Pharmacol Soc*. 2005;48:102-7.
- Larrey D, Amouyal G, Tinel M, Letteron P, Berson A, Labbe G, Pessayre D. Polymorphism of dextromethorphan oxidation in a French population. *Br J Clin Pharmacol*. 1987;24:676-9.
- Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*. 1998;8:529-41.
- Llerena A. Metabolización hepática de fármacos: interacciones genético-ambientales en el polimorfismo de debrisoquina. Tesis Doctoral 1988. Universidad de Extremadura.
- Llerena A, Cobaleda J, Martínez C, Benítez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1996;21:129-38.
- Llerena A, Dorado P, Peñas-Lledó EM. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics*. 2009;10:17-28.
- Llerena A, Dorado P, O'Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML. Lower frequency of CYP2C9\*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J*. 2004;4:403-6.
- Llerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Alvarez M, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Calzadilla LR. CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J*. 2012;12:176-83.
- Llerena A, Edman G, Cobaleda J, Benítez J, Schalling D, Bertilsson L. Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6. *Acta Psychiatr Scand*. 1993;87:23-8.
- Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;58:641-9.
- López M, Dorado P, Monroy N, Alonso ME, Jung-Cook H, Machín E, Peñas-Lledó E, Llerena A. Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. *Drug Metabol Drug Interact*. 2011;26:5-12.
- López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61:749-54.
- Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene*. 1999;226:327-38.
- Luo HR, Aloumanis V, Lin KM, Gurwitz D, Wan YJ. Polymorphisms of CYP2C19 and CYP2D6 in Israeli ethnic groups. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:395-401.

- Luo HR, Gaedigk A, Aloumanis V, Wan YJ. Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61:797-802.
- Machorro-Lazo MV, Flores-Martínez SE, García-Zapién AG, y cols. Genetic frequency of the variant CYP2C9\*2 in Western Mexican Mestizos. HGM2003 Posters Abstracts Cancún 2003, (<http://hgm2003.hgu.mrx.acuk>)
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D54-8.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*. 1977;2:584-6.
- Mamidi RN, Satyavageswaran S, Vakkalanka SV, Chaluvadi MR, Katneni K, Brahmadevara N, Damodarram G, Subramaniam S. Polymorphism of dextromethorphan oxidation in South Indian subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66:193-200.
- Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia*. 1998;39:1317-23.
- Marandi T, Dahl ML, Kivvet RA, Rago L, Sjoqvist F. Debrisoquin and S-mephenytoin hydroxylation phenotypes and CYP2D6 genotypes in an Estonian population. *Pharmacol Toxicol*. 1996;78:303-7.
- Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*. 2000;84:775-8.
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F.. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997;7:193-202.
- Marinac JS, Foxworth JW, Willsie SK. Dextromethorphan polymorphic hepatic oxidation (CYP2D6) in healthy black American adult subjects. *Ther Drug Monit*. 1995;17:120-4.
- Mas S, Crescenti A, Vidal-Taboada JM, Bergeño S, Cuevillas F, Laso N, Molina R, Ballesta A, Lafuente A. Simultaneous genotyping of CYP2C9\*2, \*3, and 5' flanking region (C-1189T) polymorphisms in a Spanish population through a new minisequencing multiplex single-base extension analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61:635-41.
- Masimirembwa C, Hasler J, Bertilssons L, Johansson I, Ekberg O, Ingelman-Sundberg M. Phenotype and genotype analysis of debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) in a black Zimbabwean population. Reduced enzyme activity and evaluation of metabolic correlation of CYP2D6 probe drugs. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996;51:117-22.
- McCauley-Myers DL, Eichhold TH, Bailey RE, Dobrozsi DJ, Best KJ, Hayes JW 2nd, Hoke SH 2nd. Rapid bioanalytical determination of dextromethorphan in canine plasma by dilute-and-shoot preparation combined with one minute per sample LC-MS/MS analysis to optimize formulations for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;23:825-35.
- McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L, Lo MW, Waldman S, Bjornsson T, Spielberg S, Goldberg MR. Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;65:348-52.
- McFayden MC, Melvin WT, Murray GI. Regional distribution of individual forms of cytochrome P-450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:825-30.
- McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* 1997;7:187-91.

- Mendoza R, Wan YJ, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin KM. CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:552-60.
- Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct.* 2006;24:381-5.
- Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:269-96.
- Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P-450C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;45:525-38.
- Morin S, Lorient MA, Poirier JM, Tenneze L, Beaune PH, Funck-Brentano C, Jaillon P, Becquemont L. Is diclofenac a valuable CYP2C9 probe in humans? *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;56:793-7.
- Muñoz S, Vollrath V, Vallejos MP, Miquel JF, Covarrubias C, Raddatz A, Chianale J. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics.* 1998;8:343-51.
- Mwinyi J, Cavaco I, Yurdakok B, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. The ligands of estrogen receptor  $\alpha$  regulate cytochrome P450C9 (CYP2C9) expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(1):302-9.
- Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther.* 1985;38:402-8.
- Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics.* 1997;7:405-9.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 1987;6:1-11.
- Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B. The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA.* 1989;8:1-13.
- Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, Forkasiewicz Z. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002;58:533-5.
- Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro N. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. *Ther Drug Monit.* 2000;22:230-2.
- Nishida Y, Fukuda T, Yamamoto I, Azuma J. CYP2D6 genotypes in a Japanese population: low frequencies of CYP2D6 gene duplication but high frequency of CYP2D6\*10. *Pharmacogenetics.* 2000;10:567-70.
- Nowak MP, Tyndale RF, Sellers EM. CYP2D6 phenotype and genotype in a Canadian Native Indian population. *Pharmacogenetics.* 1997;7:145-8.
- Nsabayumva F, Furet Y, Autret E, Jonville AP, Breteau M. Oxidative polymorphism of dextromethorphan in a Burundi population. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41:75-7.
- Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, Uwai Y, Hattori H, Furusho K, Inui K. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:287-92.

- Oksbjerg S, Johansen C, Mellekjær L, Toft H, Nørgård B, Jørgen H. Use of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Risk of Upper Gastrointestinal Tract Bleeding. *Arch Intern Med.* 2003;163:59-64.
- Oliveira E, Marsh S, van Booven DJ, Amorim A, Prata MJ, McLeod HL. Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics.* 2007;8:703-12.
- Page MA, Boutagy JS, Shenfield GM. A screening test for slow metabolisers of tolbutamide. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;31:649-54.
- Pai H, Kommaddi R, Chinta S, Mori T, Boyd M, Ravindranath V. A frameshift mutation and alternate splicing in human brain generate a functional form of the pseudogene cytochrome P4502D7 that demethylates codeine to morphine. *J Biol Chem.* 2004;279:27383-9.
- Panserat S, Sica L, Gerard N, Mathieu H, Jacqz-Aigrain E, Krishnamoorthy R. CYP2D6 polymorphism in a Gabonese population: contribution of the CYP2D6\*2 and CYP2D6\*17 alleles to the high prevalence of the intermediate metabolic phenotype. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47:121-4.
- Pedersen RS, Damkier P, Brosen K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:458-67.
- Pelkonen O, Sotaniemi EA. Environmental factors of enzyme induction and inhibition. *Pharmacol Ther.* 1987;33:115-20.
- Peyvandi F, Spreafico M, Karimi M, Zeinali S, Mannucci PM, Bianchi Bonomi A. Allele frequency of CYP2C9 gene polymorphisms in Iran. *Thromb Haemost.* 2002;88:874-5.
- Philpot RM. Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Meth Enzymology.* 1991;206:623-31.
- Pickar D, Rubinow K. Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:75-83.
- Polinko M, Riffel K, Song H, Lo MW. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;33:73-84.
- Rang HP, Dale MM. *Farmacología.* Elsevier España, S.A., 2008. 844 pág.
- Relling MV, Giacomini KM. Capítulo 4, *Farmacogenética en Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. Las bases farmacológicas de la Terapéutica.* McGraw Hill Professional. 11ª Ed. 2005. 2018 pág.
- Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics.* 1994;4:39-42.
- Ritter MA, Furtek CI, Lo MW. An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15:1021-9.
- Roh HK, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Cha YN, Bertilsson L. Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation phenotypes and genotypes in a Korean population. *Pharmacogenetics.* 1996;6:441-7.
- Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P-450IIC subfamily. *Biochemistry.* 1991;30:3247-55. Erratum in: *Biochemistry* 1991;32:1390.
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997;60:284-95.
- Sams C, Mason HJ, Rawbone R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by

- cytochrome P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxic Lett.* 2000;116:217-21.
- Sánchez-Diz P, Estany-Gestal A, Aguirre C, Blanco A, Carracedo A, Ibáñez L, Passiu M, Provezza L, Ramos-Ruiz R, Ruiz B, Salado-Valdivieso I, Velasco EA, Figueiras A. Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe. *Pharmacogenomics J.* 2009;9:306-10. Epub 2009 Apr 21. Erratum in: *Pharmacogenomics J.* 2010;10:243.
- Sandberg M, Johansson I, Christensen M, Rane A, Eliasson E. The impact of CYP2C9 genetics and oral contraceptives on cytochrome P450 2C9 phenotype. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:484-9.
- Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet.* 1994;3:923-6.
- Schellens JH, Breimer DD. Variability in drug metabolism: importance of genetic constitution. *Pharm Weekbl Sci.* 1987;9:85-90.
- Schmid B, Bircher J, Preisig R, Kupfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther.* 1985;38:618-24.
- Schmider J, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Karsov D, Shader RI. Inhibition of CYP2C9 by selective serotonin reuptake inhibitors in vitro: studies of phenytoin p-hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;44:495-8.
- Schwarz UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C9 gene. *Eur J Clin Invest.* 2003;33 Suppl 2:23-30.
- Scordo MG, Aklillu E, Yasar Ü, Dahl M-L, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of Cytochrome P-450 2C9 in a Caucasian and a Black-African population. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52:447-51.
- Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res.* 2004;50:195-200.
- Shah HJ, Kundlik ML, Patel NK, Subbaiah G, Patel DM, Suhagia BN, Patel CN. Rapid determination of losartan and losartan acid in human plasma by multiplexed LC-MS/MS. *J Sep Sci.* 2009;32:3388-94.
- Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss GA, Pohl LR. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol.* 1999;12:214-22.
- Shimada T. Xenobiotic-Metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21:257-76.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270:414-23.
- Shimamoto J, Ieiri I, Urae A, Kimura M, Irie S, Kubota T, Chiba K, Ishizaki T, Otsubo K, Higuchi S. Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9\*3 allele. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56:65-8.
- Siest G., Jeannesson E., Visvikis-Siest S. Enzymes and pharmacogenetics of cardiovascular drugs. *Clin Chim Acta.* 2007;381:26-31.
- Skretkiewicz J, Wojtczak A, Rychlik-Sych M. Polymorphism of dextromethorphan oxidation in Polish population. *Acta Pol Pharm.* 2008;65:611-5.
- Smith DA, Abel SM, Hyland R, Jones BC. Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in

- vivo. *Xenobiotica*. 1998;28:1095-128.
- Sosa-Macías M, Dorado P, Alanis-Bañuelos RE, Llerena A, Lares-Asseff I. Influence of CYP2D6 deletion, multiplication, -1584C-->G, 31G-->A and 2988G-->A gene polymorphisms on dextromethorphan metabolism among Mexican tepehuanos and mestizos. *Pharmacology*. 2010;86:30-6.
- Sosa-Macias M, Elizondo G, Flores-Perez C, Flores-Perez J, Bradley-Alvarez F, Alanis-Banuelos RE, Lares-Asseff I. CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico. *J Clin Pharmacol*. 2006;46:527-36.
- Spina E, Campo GM, Avenoso A, Caputi AP, Zuccaro P, Pacifici R, Gatti G, Strada G, Bartoli A, Perucca E. CYP2D6-related oxidation polymorphism in Italy. *Pharmacol Res*. 1994;29:281-9.
- Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos*. 1995;23:207-15.
- Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*. 1995;5:215-23.
- Straka RJ, Hansen SR, Walker PF. Comparison of the prevalence of the poor metabolizer phenotype for CYP2D6 between 203 Hmong subjects and 280 white subjects residing in Minnesota. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;58:29-34.
- Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P-450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*. 1996;6:429-39.
- Suarez-Kurtz G, Pena SD. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets*. 2006;7:1649-58.
- Suarez-Kurtz, Sergio DJ. Pena Pharmacogenetic studies in the Brazilian population en Capítulo 6 de en el Capítulo 5 de Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. Instituto Nacional del Cancer. Landes Bioscience. Río de Janeiro, Brasil. 2007. 222 pág.
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996;6:341-9.
- Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics*. 1998;8:365-73.
- Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics*. 2000;10:95-104.
- Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH. The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57:717-22.
- Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Wielling J, Wilffert B, De leij LF, De Zeeuw RA, Jonkam JH. CYP2D6 and CYP2C19 activity in a large population of Dutch healthy volunteers: indications for oral contraceptive-related gender differences. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55:177-84.
- Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SH, Baillie TA. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol*. 1999;12:192-9.

- Tateishi T, Chida M, Ariyoshi N, Mizorogi Y, Kamataki T, Kobayashi S. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:570-5.
- Tatsumi A, Ikegami Y, Morii R, Sugiyama M, Kadobayashi M, Iwakawa S. Effect of ethanol on S-warfarin and diclofenac metabolism by recombinant human CYP2C9.1. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(3):517-9.
- Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood.* 2000;96:1816-9.
- Teh LK, Ismail R, Yusoff R, Hussein A, Isa MN, Rahman AR. Heterogeneity of the CYP2D6 gene among Malays in Malaysia. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:205-11.
- Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, Boulenc X. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68:928-35.
- van der Weide J, Steijns L. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem.* 1999;36:722-9.
- van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. [Maintenance dose requirement for phenytoin is lowered in genetically impaired drug metabolism independent of concomitant use of other antiepileptics]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2001;145:312-5.
- Van Schaik RH. Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs.* 2005;23:513-22.
- Veronese ME, Miners JO, Rees DL, Birkett DJ. Tolbutamide hydroxylation in humans: lack of bimodality in 106 healthy subjects. *Pharmacogenetics.* 1993;3:86-93.
- Verstuyft C, Morin S, Robert A, Lorient MA, Beaune P, Jaillon P, Becquemont L. Early acenocoumarol overanticoagulation among cytochrome P-450 2C9 poor metabolizers. *Pharmacogenetics.* 2001;11:735-7.
- Vesell ES. Pharmacogenetics perspectives: Genes, drug and disease. *Hepatology.* 1984;4:959-65.
- Vesell ES. Pharmacogenetics: multiple interactions between genes and environment as determinants of drug response. *Am J Med.* 1979;66:183-7.
- Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76:18-26.
- Wang B, Sanchez RI, Franklin RB, Evans DC, Huskey SE. The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 alpha-ethinylestradiol. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:1209-12.
- Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics.* 1995;5:37-42.
- Wan YJ, Poland RH, Han G, Konishi T, Zheng YP, Berman N, Lin KM. Analysis of the CYP2D6 gene polymorphism and enzyme activity in African-Americans in Southern California. *Pharmacogenetics.* 2001;11:489-99.
- Wennerholm A, Johansson I, Masele AY, Lande M, Alm C, Aden-Abdi Y, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Gustafsson LL. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics.* 1999;9:707-14.
- Wesseling H, Mols-Thurkow I. Interaction of diphenylhydantoin (DPH) and tolbutamide in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1975;8:75-8.
- Wheeler CW, Guenther TM. Spectroscopic quantitation of cytochromeP-450 in human lung

- microsomes. *J. Biochem Toxicol.* 1990;5:269-72.
- Wojtczak A, Rychlik-Sych M, Krochmalska-Ulacha E, Skretkiewicz J. CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan. *Pharmacol Rep.* 2007;59:734-8.
- Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 1992;22:1-21.
- Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:1257-70.
- Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, Ozawa N, Kawai T, Suzuki Y, Goldstein JA, Guengerich FP, Shimada T. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P-450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:243-51.
- Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1997;346:161-9.
- Yang JQ, Morin S, Verstuyft C, Fan LA, Zhang Y, Xu CD, Barbu V, Funck-Brentano C, Jaillon P, Becquemont L. Frequency of cytochrome P450 2C9 allelic variants in the Chinese and French populations. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17:373-6. Erratum in: *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18:397.
- Yasar U, Aklillu E, Canaparo R, Sandberg M, Sayi J, Roh HK, Wennerholm A. Analysis of CYP2C9\*5 in Caucasian, Oriental and black-African populations. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002b;58:555-8.
- Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjöqvist F, Eliasson E, Dahl ML. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2002a;71:89-98.
- Yasar Ü, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:628-31. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:227.
- Yasar U, Tybring G, Hildestrand M, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Dahl ML, Eliasson E. Role the CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos.* 2001;29:1051-6.
- Yeh GC, Tao PL, Ho HO, Lee YJ, Chen JY, Sheu MT. Analysis of pharmacokinetic parameters for assessment of dextromethorphan metabolic phenotypes. *J Biomed Sci.* 2003;10:552-64.
- Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *Int J Pharm.* 2000;204:17-22.
- Yilmaz N, Erbagci AB, Aynacioglu AS. Cytochrome P-4502C9 genotype in Southeast Anatolia and possible relation with some serum tumour markers and cytokines. *Acta Biochim Pol.* 2001;48:775-82.
- Yokota H, Tamura S, Furuya H, Kimura S, Watanabe M, Kanazawa I, Kondo I, Gonzalez FJ. Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics.* 1993;3:256-63.
- Yoon YR, Shon JH, Kim MK, Lim YC, Lee HR, Park JY, Cha IJ, Shin JG. Frequency of cytochrome P-450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;51:277-80.
- Yu A, Haining RL. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metab Dispos.* 2001;29:1514-20.



- Yu BN, Luo CH, Wang D, Wang A, Li Z, Zhang W, Mo W, Zhou HH. CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. *Clin Chim Acta*. 2004;348:57-61.
- Yun CH, Lee HS, Lee H, Rho JK, Jeong HG, Guengerich FP. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (Dup 753) in human liver microsomes. Role of cytochrome P4503A(4) in formation of the active metabolite EXP3174. *Drug Metab Dispos*. 1995;23:285-9.
- Zand N, Tajik N, Moghaddam AS, Milanian I. Genetic polymorphisms of cytochromeP450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Iranian population. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:102-5. Erratum in: *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:385.
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Arch Pharmacol*. 2004;369:23-37.
- Zhang M, Wei F, Zhang YF, Nie J, Feng YQ. Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2006;1102:294-301.
- Zhou SF, Zhou ZW, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology*. 2010;278:165-88.

#### Sitio Web

Instituto Nacional de Estadística (INE). España. 2003. Disponible en: [www.ine.es/](http://www.ine.es/)

The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponible en [www.CYPalleles.ki.se/cyp2c9.htm](http://www.CYPalleles.ki.se/cyp2c9.htm).

The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponible en: [www.CYPalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.CYPalleles.ki.se/cyp2d6.htm).

## VIII. AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

	<b>Página</b>
<b>1. AGRADECIMIENTOS</b> .....	134
<b>2. FINANCIACIÓN</b> .....	135

## **1. AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento y dar las gracias a todas aquellas personas que durante estos tres años han participado de alguna manera a la realización de esta Tesis, en particular:

A mis tutores, los doctores Adrián LLerena y Pedro Dorado.

Al Dr. Adrián LLerena por su trabajo, dedicación y compromiso en mi formación tanto a nivel profesional como personal. Así como también, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación.

Al Dr. Pedro Dorado, por su esfuerzo, dedicación y por sus conocimientos transmitidos. Además de sus palabras de aliento valiosos consejos tanto en el ámbito personal como profesional.

A la Doctora Eva Peñas por su inestimable ayuda en la consecución de esta Tesis y escritura de los artículos, así como también por sus palabras de ánimo.

A la Universidad Central de Ecuador (Quito), en especial al Doctor Enrique Terán. A Natalia Heras y Leonardo Beltrán por su ayuda en la recolección y análisis de las muestras de voluntarios.

A Beatriz Grillo e Inés López por su compañerismo, ayuda y su contribución en el trabajo del laboratorio, además de por sus palabras de ánimo y su amistad.

Al Doctor Humberto Fariñas por su apoyo y cariño durante todo este tiempo.

Al personal del CiCAB, en especial al Doctor Fernando de Andrés por su ayuda en la etapa final, la Doctora Macarena Cáceres, Pepa González y Sara de la Rubia. Además del resto de personas que en algún momento han formado parte de él.

A todos los voluntarios, sin cuya participación desinteresada hubiera sido imposible la realización de los estudios de esta Tesis.

A mi familia y amigos, en especial a mi madre y mis hermanas por su ayuda, paciencia y apoyo incondicional que tan importante ha sido para mí durante todo este tiempo.

## 2. FINANCIACIÓN

Los estudios que configuran la presente Tesis han sido cofinanciados por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i), el Instituto de Salud Carlos III-FIS y el Fondo Social Europeo de la Unión Europea (FEDER) (**PI10/02758, PI10/02010**), CIBERSAM y CAIBER del Ministerio de Ciencia e Innovación y Fondo Social Europeo de la Comunidad Europea (FEDER), el Plan de Investigación Sanitaria en Extremadura, Consejería de Sanidad y Dependencia (FundeSalud) (**PRIS10043**), Cooperación Extremeña del Gobierno de Extremadura (**AEXCID**) y coordinado por la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (**SIFF-RIBEF**; [www.ribef.com](http://www.ribef.com); **9IA006, 11IA002**), el Gobierno de Extremadura y Fondo Social Europeo de la Unión Europea (FEDER) (**PRIS11051; BS10023**)

Pedro Dorado Hernández está contratado dentro del Programa “Miguel Servet” del Instituto de Salud Carlos III (**CP06/00030**), Ministerio de Ciencia e Innovación. Fondo Social Europeo de la Comunidad Europea (FEDER).

María Eugenia González Naranjo está contratada dentro del Programa de “Ayudas para la formación del personal investigador predoctoral” (**PD10199**) del Gobierno de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e Innovación y el Fondo Social Europeo de la Unión Europea (FEDER).

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en colaboración con el Centro de Investigación Clínica del Área de Salud de Badajoz. CiCAB. Hospital Universitario Infanta Cristina. Badajoz y coordinado por la RIBEF (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica; [www.ribef.com](http://www.ribef.com)) en el consorcio CEIBA para el estudio de Farmacogenética de poblaciones iberoamericanas.



## IX. ANEXOS

---

1. INDICE DE TABLAS.....	137
2. INDICE DE FIGURAS.....	139
3. INDICE DE ABREVIATURAS.....	141

---

## 1. ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla I.** Frecuencia (%) de Metabolizadores Lentos de dextrometorfano en diferentes estudios de voluntarios sanos.

**Tabla II.** Variantes alélicas del gen *CYP2D6* más frecuentes en poblaciones europeas, asiáticas y africanas (Dorado, 2003).

**Tabla III.** Valores asignados a cada alelo del gen *CYP2D6* (Gaedigk y cols., 2008).

**Tabla IV.** Frecuencias alélicas del *CYP2D6* en diferentes poblaciones.

**Tabla V.** Algunos fármacos cuyo metabolismo es catalizado por *CYP2D6* (ampliada de González, 2006).

**Tabla VI.** Estudios de la actividad *CYP2C9* en poblaciones realizados con diferentes fármacos test.

**Tabla VII.** Algunas de las diferentes variantes alélicas del gen *CYP2C9* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>).

**Tabla VIII.** Frecuencias alélicas (%) del *CYP2C9* en voluntarios sanos de diferentes poblaciones estudiados.

**Tabla IX.** Descripción general de las poblaciones de estudio de la presente Tesis.

**Tabla X.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCRs para determinación de las variantes alélicas del *CYP2D6* (Dorado y cols., 2005).

**Tabla XI.** Primers y tamaño de las amplificaciones para la determinación de las multiplicaciones y delección del *CYP2D6*.

**Tabla XII.** Sondas TaqMan utilizadas para la determinación de las variantes alélicas del *CYP2D6*.

**Tabla XIII.** Sondas TaqMan utilizadas para la determinación de las variantes alélicas del *CYP2C9*.

**Tabla XIV.** Recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método para medir dextrometorfano y dextrorfano.

**Tabla XV.** Frecuencias genotípicas observadas y esperadas del *CYP2D6* en una población de voluntarios sanos de Ecuador.

**Tabla XVI.** Frecuencias alélicas de *CYP2D6* de la población ecuatoriana y española.

**Tabla XVII.** Recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud del método para medir losartán y E-3174.

**Tabla XVIII.** Porcentaje de los genotipos observados y esperados del *CYP2C9* en una población de voluntarios sanos de Ecuador (n=194).

**Tabla XIX.** Frecuencias alélicas de *CYP2C9* de la población ecuatoriana y española.

**Tabla XX.** IM losartán/E-3174 entre los diferentes genotipos en una población de 194 voluntarios sanos.

**Tabla XXI.** Comparación de los genotipos *CYP2C9* y el IM losartán/E-3174 de muestras de orina recogidas entre las 0-8 horas en la población ecuatoriana y panel de voluntarios sanos españoles (Estudio II.1).

**Tabla XXII.** IM losartán/E-3174 dividido por género.

**Tabla XXIII.** Porcentajes de las variantes alélicas de *CYP2D6* y metabolizadores lentos en la población ecuatoriana (n=118) y poblaciones hispanas previamente estudiadas.

**Tabla XXIV.** Genotipos de *CYP2C9* e IM losartán/E-3174 (0-8 horas) en diferentes poblaciones en comparación con la población de Ecuador del presente estudio.

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Porcentaje aproximado de los principales citocromos P-450 (CYP) presentes en el hígado (Figura adaptada de Dorado, 2003).

**Figura 2.** Distribución del  $\text{Log}_{10}$  del IM debrisoquina/4'-OH debrisoquina en 925 voluntarios sanos españoles (LLerena y cols., 1993) (línea vertical: antimoda en 1.1).

**Figura 3.** Representación esquemática del Locus *CYP2D* en el cromosoma 22 (Figura adaptada de Maglott y cols., 2005).

**Figura 4.** Representación del Locus *CYP2C* dentro del cromosoma 10.

**Figura 5.** Fórmula estructural del dextrometorfano.

**Figura 6.** Esquema de las vías de metabolización de dextrometorfano (basada en Yu y Haining, 2001).

**Figura 7.** Principal vía de metabolización del losartán.

**Figura 8.** Cromatogramas de plasma humano con dextrometorfano, levallorfan y dextrorfano. A) Cromatograma de plasma humano blanco en el que se le ha añadido dextrometorfano, dextrorfano y levallorfan; B) Cromatograma de plasma humano blanco sin analitos.

**Figura 9.** Histograma de los Índices Metabólicos (IM) de dextrometorfano/dextrorfano en muestras de plasma recogidas a las 3 horas obtenidas de 118 voluntarios sanos.

**Figura 10.** Curvas de distribución de los  $\text{Log}_e$  de los IM dextrometorfano/dextrorfano de la población ecuatoriana y española [línea azul: distribución de la población española; línea roja: distribución de la población ecuatoriana].

**Figura 11.** Relación entre los ratios metabólicos de dextrometorfano/dextrorfano en muestras de plasma recogidas a las 3 h y los genotipos de *CYP2D6* de 118 voluntarios sanos.

**Figura 12.** Cromatogramas obtenidos de orina humana con los dos metabolitos añadidos (A) y de orina humana blanco (B). [Pico 1: losartán; 2: E-3174].

**Figura 13.** Relación entre  $\text{log}_{10}$ IM losartán/E-3174 y genotipos del *CYP2C9* en 13 voluntarios sanos analizados con este nuevo método y otro previamente publicado († Yasar y cols.,



2002). Los cromatogramas fueron obtenidos del análisis de muestras de orina de individuos *CYP2C9\*1/\*1* y *CYP2C9\*3/\*3* (Pico 1: losartán, 2: E-3174)

**Figura 14.** (A) Histograma del  $\log_{10}$  de los IM de losartán/E-3174 en muestras de orina recogidas a las 8 horas obtenidas de 194 voluntarios sanos de Ecuador (la línea muestra la media del  $\log_{10}$  de los IM de losartán/E-3174 de toda la población. La flecha continua muestra la media de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 en toda la población. La flecha discontinua muestra el hipotético punto de corte del grupo PM calculado a partir de las medias de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 de los individuos *CYP2C9\*3/\*3* recogidas de (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004). (B) Histograma de los IM diclofenaco/4'-OHdiclofenaco en una población de voluntarios sanos españoles (Dorado y cols., 2003c).

**Figura 15.** Histogramas de los IM de losartán/E-3174 en los diferentes genotipos de una población de 194 voluntarios sanos. La flecha continua muestra la media de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 en toda la población. La flecha discontinua muestra el hipotético punto de corte del grupo PM calculado a partir de las medias de los  $\log_{10}$  IM losartán/E-3174 de los individuos *CYP2C9\*3/\*3* recogidas de (Yasar y cols., 2002a; Babaoglu y cols., 2004; Sandberg y cols., 2004). La línea continua muestra la media de los IM en cada grupo de genotipos.

**Figura 16.** Frecuencias alélicas para *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* en diferentes poblaciones previamente publicadas (Sánchez-Diz y cols., 2009; Xie y cols., 2002; LLerena y cols., 2004; Dorado y cols., 2007; 2011) Las barras en amarillo corresponden a la población ecuatoriana del presente estudio y la población española.

### 3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>°C:</b>	grado Celsius.
<b>µg:</b>	microgramo.
<b>µL:</b>	microlitro.
<b>µM:</b>	micromolar.
<b>µm:</b>	micrómetros.
<b>ADN:</b>	ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNc:</b>	ADN complementario.
<b>AINE:</b>	antiinflamatorio no esteroideo.
<b>ANOVA:</b>	análisis de la varianza.
<b>ARNm:</b>	ácido ribonucleico mensajero.
<b>B[α]P:</b>	benzo[α]pirenos.
<b>CAR:</b>	receptor constitutivo de andostrano.
<b>CO:</b>	monóxido de carbono.
<b>CV:</b>	coeficiente de variación.
<b>CYP:</b>	citocromo P450.
<b>dNTPs:</b>	dinucleótidos trifosfato.
<b>DS:</b>	desviación estándar.
<b>EDTA:</b>	ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EI:</b>	estándar interno.
<b>EM:</b>	metabolizador rápido (del inglés extensive metabolizer).
<b>FLU:</b>	fluorescencia.
<b>HPLC:</b>	cromatografía líquida de alta resolución.
<b>IM:</b>	índice metabólico.
<b>kb:</b>	Kilobases.
<b>kDa:</b>	KiloDaltons.
<b>kg:</b>	Kilogramo.
<b>msnm:</b>	metros sobre el nivel del mar.
<b>mg:</b>	miligramo.
<b>min:</b>	minuto.

<b>mL:</b>	mililitro.
<b>mM:</b>	milimolar.
<b>MS:</b>	espectrometría de masas.
<b>MTBE:</b>	metil tert butil éter.
<b>NADPH:</b>	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido.
<b>ng:</b>	nanogramo.
<b>nm:</b>	nanómetro.
<b>pb:</b>	pares de bases.
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa.
<b>pHPPH:</b>	5-(4-p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina.
<b>PM:</b>	metabolizador lento (del inglés, poor metabolizer).
<b>PXR:</b>	receptor X de pregnano.
<b>r:</b>	coeficiente de correlación.
<b>r<sup>2</sup>:</b>	coeficiente de correlación cuadrático.
<b>RFLP:</b>	polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (del inglés, restriction fragment length polymorphism).
<b>rpm:</b>	revoluciones por minuto.
<b>RT-PCR:</b>	PCR a tiempo real (real time PCR).
<b>s:</b>	segundo.
<b>SNP:</b>	polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés, single nucleotide polymorphism).
<b>UM:</b>	metabolizador ultrarrápido (del inglés, ultrarapid metabolizer).
<b>UV:</b>	ultravioleta.
<b>wt:</b>	silvestre (del inglés, wild type).
<b>XL-PCR:</b>	PCR de fragmentos extra-largos (extra-long PCR).
<b>χ<sup>2</sup>:</b>	Chi-cuadrado.

## X. PUBLICACIONES

---

1. López M, Dorado P, Monroy N, Alonso ME, Jung-Cook H, Machín E, Peñas-Lledó E, Llerena A. Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. Drug Metab Drug Interac 2011;26:5-12.
  2. Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Terán E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. Eur J Clin Pharmacol 2012;68:637-44.
  3. Dorado P, Machín E, de Andrés F, González-Naranjo ME, Peñas-Lledó E, Llerena A, CEIBA. Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes. Drug Metab Drug Interac 2012 (En prensa).
  4. Dorado P, Beltrán L, Machín E, Peñas-Lledó EM, Terán E, Llerena A. Losartan hydroxylation phenotype in a Ecuadorian population: influence of CYP2C9 genetic polymorphism, habits and gender. Pharmacogenomics 2012;13:1711-17.
-

**COMUNICACIONES A CONGRESOS**

---

1. Alanis-Bañuelos RE, Machín E, Llerena A, Dorado P. Development and validation of a new HPLC method with ultraviolet detection for simultaneous determination of dextromethorphan and its metabolites dextrorphan and 3-methoxymorphinan in human plasma: application to the assessment of CYP2D6 and CYP3A4 activity. XXII Congress Spanish Society for Clinical Pharmacology and XXVII Portuguese Meeting of Clinical Pharmacology. XXII SEFC and XXVII SPF-FC. Badajoz (España), 13-16 Octubre de 2009.

2. Dorado P, Ortega A, Alonso E, Machín E, Jung Cook H, Peñas-Lledó EM, López M, Llerena A. Interethnic differences in genetic polymorphism of UGT1A4 in Mexican and Spanish populations: clinical implications in epilepsy. 5th Santorini Conference Biologie Prospective. Santorini (Grecia), 30 Septiembre-2 Octubre 2010.

**Publicación: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2010 (A65)**

3. Dorado P, López M, Ortega A, Peñas-Lledó EM, Monro N, Machín E, Alonso ME, Llerena A. Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphism in Mexican and Spanish populations. 4th International Congress on Psychopharmacology. Antalya (Turquia), 23-27 Octubre de 2011.

**Publicación: Bulletin of Clinical Psychopharmacology 2011;21(Suppl.2):s131.**

4. Dorado P, Peñas-Lledó EM, Machín E, Llerena A, Terán E, Beltrán L. Influence of CYP2C9 genetic polymorphism on losartan oxidation in a Ecuadorian population. 4th International Congress on Psychopharmacology. Antalya (Turquia), 23-27 Octubre de 2011.

**Publicación: Bulletin of Clinical Psychopharmacology 2011;21(Suppl.2):s131.**

5. Dorado P, Machín E, De Andrés F, González-Naranjo ME, De La Rubia S, Peñas-Lledó EM, Llerena A. New high-performance liquid chromatography method using ultraviolet detection for the quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in psychiatric patients. 6th Santorini Conference Biologie Prospective "System Biology and Personalized Health Science and Translation". Santorini (Grecia), 30 Septiembre-2 Octubre de 2012.

6. Dorado P, Machín E, De Andrés F, González-Naranjo ME, Peñas-Lledó EM, Llerena A and CEIBA.FP consortium of the ibero-american network of pharmacogenetics and pharmacogenomics RIBEF. Development of a new HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio and its relation to CYP2C9 genotypes. 6th Santorini Conference Biologie Prospective "System Biology and Personalized Health Science and Translation". Santorini (Grecia), 30 Septiembre-2 Octubre de 2012.

7. Dorado P, Machín E, Beltrán L, González-Naranjo ME, Peñas-Lledó, Terán E, Llerena A. Influence of CYP2C9 genetic polymorphism on losartan oxidation in a Ecuadorian population. 6th Santorini Conference Biologie Prospective "System Biology and Personalized Health Science and Translation". Santorini (Grecia), 30 Septiembre-2 Octubre de 2012.

---

## Review

# Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine

Marisol López<sup>1,a</sup>, Pedro Dorado<sup>2,a,\*</sup>, Nancy Monroy<sup>3</sup>,  
María Elisa Alonso<sup>3</sup>, Helgi Jung-Cook<sup>4,5</sup>, Esther  
Machín<sup>2</sup>, Eva Peñas-Lledó<sup>2</sup> and Adrián Llerena<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Systems, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> CICAB Clinical Research Center, Extremadura University Hospital and Medical School, Servicio Extremeño de Salud, Badajoz, Spain

<sup>3</sup> Department of Neurogenetics and Molecular Biology, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Department of Neuropharmacology, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Department of Pharmacy, Chemistry Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## Abstract

Patients treated with antiepileptic drugs can exhibit large inter-individual variability in clinical efficacy or adverse effects. This could be partially due to genetic variants in genes coding for proteins that function as drug metabolizing enzymes, drug transporters or drug targets. The purpose of this article is to provide an overview of the current knowledge on the pharmacogenetics of two commonly prescribed antiepileptic drugs with similar mechanisms of action; phenytoin (PHT) and lamotrigine (LTG). These two drugs have been selected in order to model the pharmacogenetics of Phase I and Phase II metabolism for PHT and LTG, respectively. In light of the present evidence, patients treated with PHT could benefit from *CYP2C9* and *CYP2C19* genotyping/phenotyping. For those under treatment with LTG, *UGT1A4* and *UGT2B7* genotyping might be of clinical use and could contribute to the interindividual variability in LTG concentration to dose ratio in epileptic patients.

<sup>a</sup>M. López and P. Dorado contributed equally to this work.

\*Corresponding authors: Pedro Dorado/Adrián Llerena, CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Servicio Extremeño de Salud, Badajoz, Spain  
E-mail: allerena@unex.es

Received February 24, 2011; accepted April 5, 2011

**Keywords:** antiepileptic drug; cytochrome P450; lamotrigine; pharmacogenetics; phenytoin; UDP-glucuronosyltransferase (UGT).

## Pharmacotherapy of epilepsy

### Epilepsy: definition and epidemiology

Epilepsy is a multifactorial disorder characterized by recurrent unprovoked seizures, which is the clinical manifestation of uncontrolled electrical activity by a group of neurons. Clinically, epilepsy is defined by the occurrence of two or more unprovoked seizures (1). The epilepsies affect approximately 50 million people worldwide, with an annual incidence of 50–70 cases per 100,000 in industrialized countries and this could be even much higher in developing countries (2). Thus, it approximately affects 1%–2% of the whole population, becoming the most prevalent chronic neurological affection (3, 4) and a problem of public health relevance in the world (5).

### Pharmacological treatment

The goal of treatment with antiepileptic drugs (AEDs) is to attain seizure freedom without side effects and return patients to normal healthy lifestyles (6). Currently there are more than 17 drugs approved for the treatment of epilepsies. Among these, phenytoin (PHT) and lamotrigine (LTG) are two of the AEDs first line therapies. AED treatments are of relevance because they are shown to control seizures in up to 70% of patients in new onset epilepsy studies (7). Although major advances have been achieved in the pharmacotherapy of epilepsy, this is refractory to medical treatment in approximately 20%–30% of the patients (8). Four main limitations inherent to AEDs have been highlighted (9), in particular when using AEDs for long-term treatments. These include (a) AEDs are ‘symptomatic’ (antiseizure and not antiepileptogenic) agents; (b) AEDs have a sub-optimal tolerability profile and can be teratogenic; (c) although second-generation AEDs have better pharmacokinetic profiles and are “better tolerated”, they may not be overall more efficacious than the older drugs; (d) the choice of AEDs is made difficult by several factors that might differ across patients.

Interindividual variability in AEDs treatment response largely depends on multiple factors such as seizure type or epilepsy syndrome, optimal dosing, administration, concomitant diseases and treatments, lifestyle, physiology, metabolism and

age (10). This variability in clinical response limits AEDs clinical utility. However, the unpredictability of AEDs efficacy, the optimal doses and the induced adverse reactions could, at least in part, result from genetic variation (11). In fact, it has been estimated that genetic factors account for 20%–95% of patient variability in response to individual drugs (12). This genetic difference has a potential effect on the clinical efficacy of AEDs and can also affect the tolerability and safety of the drugs.

Additionally, pharmacokinetic variability appears to be prevalent for some of the newer AEDs; including LTG, as in many of the older AEDs. In keeping with this, a major focus of clinical research and dosage individualization to optimize drug treatment of epilepsy has been developed; measuring drug concentrations via therapeutic drug monitoring (TDM) (13, 14). Drug dosage must be adjusted to every patient not only to improve clinical response but to avoid adverse events. Thus, TDM and pharmacogenetics are two tools to be used for such dosage individualization in order to prevent AEDs lack of clinical efficacy or induced side effects.

AEDs have also been used beyond the treatment of seizure disorders since the 1960s. As new antiepileptic drugs appeared, there has been interest in how they compare with older therapies (PHT, carbamazepine, and valproate) and with regard to various disorders (i.e., bipolar disorder, fibromyalgia, migraine prophylaxis, and chronic pain), where conventional pharmacotherapy has typically been suboptimal and limited by drug-related toxicity (15). Among new AEDs, LTG has a wide therapeutic range. Since its approval by the FDA, LTG has gained monotherapy indications for partial seizures as well as for treatment of bipolar disorders (16).

### The pharmacogenetics of the phenytoin and lamotrigine

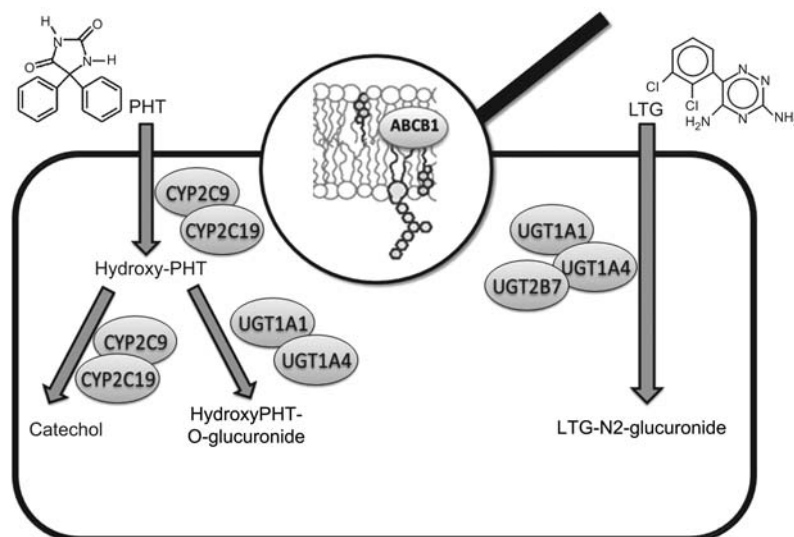
The classic AED, PHT is related to the barbiturates in chemical structure but has a five-member ring. It was first introduced

in 1938 and it is a major anticonvulsant drug that is used in a wide variety of seizures. It is also an anti-arrhythmic and a muscle relaxant. The mechanism of therapeutic action is not clear, although several cellular actions have been described, including effects on ion channels, active transport and general membrane stabilization. The mechanism of its muscle relaxant effect appears to involve a reduction in the sensitivity of muscle spindles to stretch.

The AED phenyltriazine class LTG was first introduced in 1986. LTG acts at voltage sensitive sodium channels (17) and inhibits release of excitatory neurotransmitters such as glutamate (18). LTG has been shown to be effective as monotherapy in newly diagnosed adolescents and adults with either partial or mixed seizure disorders and it is also effective for newly diagnosed absence seizures in children (19). After oral administration, LTG shows good absorption, a linear relation between dose and plasma concentration, and an elimination half-life of 25–30 h when administered as monotherapy (20). LTG elimination is mediated by hepatic glucuronidation catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases (UGT)1A4 (21), UGT2B7 (22) and possibly UGT1A1 (23–25).

This review will focus on the aromatic antiepileptic drugs PHT and LTG as examples of an old and a new antiepileptic drug, in order to model pharmacogenetics Phase I and Phase II metabolism, respectively. PHT is metabolized primarily through hydroxylation by Phase I enzymes CYP2C9 and CYP2C19, whereas glucuronidation by UGTs is the main pathway of LTG detoxification. Therefore pharmacogenetics of these two drugs as a model for Phase I and Phase II metabolism will be reviewed (Figure 1).

Moreover preventing and managing adverse effects is a major challenge in optimizing AED therapy. Factors that might affect the risk of adverse effects include: dosing frequency and rate of dose escalation, length of early tolerance development, and magnitude of peak serum concentrations (26). Therefore, dosage individualization in order to achieve



**Figure 1** Main genes involved in the distribution and metabolism of phenytoin (PTH) and lamotrigina (LTG) in a human cell.

adequate plasma concentration might help to decrease clinically relevant drug side effects.

### **CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphism and PHT metabolism**

#### **CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphism**

Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) enzymes mainly affect the pharmacokinetics of drugs that are substrates for those enzymes. Genetically caused variability in drug metabolism is reflected in differences in clearance, half-life and maximal plasma concentrations (27, 28).

Cytochrome P450 genes (*CYP*) encode Phase I drug metabolizing hemoproteins that catalyze the oxidative metabolism of many endogenous substances and exogenous compounds, in addition to clinically used drugs. The *CYP2C9* and *CYP2C19* genes are members of the *CYP2C* gene cluster located on chromosome 10q24.1-q24.3, which include *CYP2C8*, *-2C9*, *-2C18* and *-2C19*. At the present time, 34 and 28 sequence variants have been reported for *CYP2C9* and *CYP2C19*, respectively (29).

The gene encoding *CYP2C9* is highly polymorphic; it is expressed with more than 20 variant alleles. It has been reported that the major allelic variants, *CYP2C9\*1* (wild-type), *\*2* and *\*3* might cause interindividual and interethnic variability in the disposition of its substrates. The frequencies of these genetic variations in *CYP2C9* have been described for Caucasian and Asian populations showing interethnic variability (30) (Table 1).

In a Spanish population, the frequencies of *CYP2C9\*1*, *\*2*, and *\*3* alleles were 0.74 (95% CI: 0.68–0.80), 0.16 (95% CI: 0.11–0.21) and 0.10 (95% CI: 0.06–0.15), respectively (31); however, a lower frequency of *CYP2C9\*2* was found among Mexican-Americans (32). The authors hypothesized that the frequency of *CYP2C9\*2* might be related to Amerindian ancestry. Later, they showed that among Mexican Tepehuanos the frequency of *CYP2C9\*2* was lower than those of Mexican Mestizos and Spaniards, which was in agreement with such interethnic association (33). This could be of relevance for adjusting doses of *CYP2C9* substrates according to ethnical background.

There are also interethnic differences in the frequency of *CYP2C19* alleles. The genetic polymorphism of *CYP2C19*

was widely observed in Asian populations and the three polymorphic alleles *CYP2C19\*1* (wild-type), *CYP2C19\*2* and *CYP2C19\*3* were identified among Chinese (30) and Japanese (34, 35) (Table 1).

### **Pharmacogenetics of PHT and its clinical implications**

PHT is a narrow therapeutic index drug with non-linear pharmacokinetics that could be related to the implication of CYPs polymorphic enzymes in its metabolism. PHTs primary metabolic pathway is hydroxylation by *CYP2C9* to 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (*p*-HPPH). Approximately 95% of the *p*-HPPH produced by *CYP2C9* has the (*S*) configuration. *CYP2C19* is responsible for most of the (*R*)-*p*-HPPH formed (36) but this isoform usually plays a minor role in PHT hydroxylation unless the *CYP2C9* pathway becomes saturated at higher doses of the drug (14, 37, 38).

The *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* and *CYP2C19\*2* alleles affect the PHT plasma concentration and toxicity (14, 39). Several case studies reported that PHT induced central nervous system toxicities were observed when the patients were carriers of defective *CYP2C9* and/or *CYP2C19* allele(s) (14, 40, 41). Concerning the development of cutaneous adverse drug reactions (from exanthema to Stevens-Johnson's syndrome) or gingival hyperplasia during PHT therapy, it is not yet clear whether there is an association with *CYP2C9/2C19* polymorphisms (14, 42, 43).

A study in a Turkish population has shown significantly increased PHT levels and reduced *p*-HPPH/PHT ratios in individuals with *CYP2C9\*1/\*2*, *\*2/\*2* and *\*1/\*3* compared to *\*1/\*1* genotypes (44). The maximal elimination rate ( $V_{max}$  of PHT is 33% lower in patients heterozygous for *CYP2C9\*1/\*3* than in patients homozygous for *CYP2C9\*1/\*1* and is slightly decreased in patients with the *CYP2C19\*2* or *CYP2C19\*3* allele compared with those homozygous for *CYP2C9\*1/\*1* (45). Tate and collaborators found that the *CYP2C9\*3* allele showed significant association with a maximum dose of PHT (46). Taguchi and collaborators evaluated the usefulness of genotyping the *CYP2C* subfamily in predicting plasma levels and determining the dosage regimens of PHT. Their results showed correlation between the plasma PHT concentrations predicted by genotypes of the *CYP2C* subfamily and the observed concentrations in some patients. They concluded that the large variability in the clearance of PHT is not completely resolved and that it is important not to overestimate

**Table 1** Comparison of the main *CYP2C9* and *CYP2C19* alleles in two populations.

SNP	Amino acid change	Allele <sup>a</sup>	ID dbSNP	Asian, (%) <sup>a</sup> (n=560)	Caucasian, (%) (n=210)
wt	wt	<i>CYP2C9*1</i>		0.97	0.74 <sup>b</sup>
430C>T	R144C	<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853	0.00	0.16 <sup>b</sup>
1075A>C	I359L	<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	0.03	0.10 <sup>b</sup>
wt	wt	<i>CYP2C19*1</i>		0.72	0.87 <sup>c</sup>
681G>A	P227P <sup>d</sup>	<i>CYP2C19*2</i>	rs4244285	0.24	0.13 <sup>c</sup>
636G>A	W212X	<i>CYP2C19*3</i>	rs4986893	0.04	0.0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mongolian population (30), <sup>b</sup>Spaniards (n=102) (31), <sup>c</sup>European American in Yang et al. (30), <sup>d</sup>aberrant splice site.



the usefulness of genotyping the CYP2C subfamily in determining the dosage of the drug (34).

In light of the present knowledge, it is clear that genotyping of *CYP2C9* and *CYP2C19* could help to identify subjects more prone to show interindividual variability on PHT pharmacokinetics. Therefore, *CYP2C9* and *CYP2C19* genotyping could help to decrease side effects by stratifying drug dosage.

Recently, another allelic variant called *CYP2C9\*17* has been reported. This promoter variant is part of the *CYP2C19\*17* haplotype, which causes increased activity and increased transcription of *CYP2C19*. Patients carrying this allele might exhibit a lack of response to commonly prescribed dosages of certain proton pump inhibitors and antidepressants due to ultrarapid clearance of these drugs (47–49). It is under consideration for clinical biomarker tests; however, it has not been reported that this allele has any effect in phenytoin or lamotrigine clinical response. Because phenytoin is metabolized via *CYP2C19* and *CYP2C9*, we propose that further studies would be useful to evaluate this allele in terms of PHT response.

## UGT and its implication for lamotrigine metabolism

### UGT genetic polymorphisms

The UGT enzymes are responsible for the conjugation of glucuronic acid to various endogenous substances and exogenous compounds in a process known as glucuronidation. They are Phase II enzymes that are part of an evolutionary conserved detoxification system, also known as chemical defense (50). UGTs are localized in the endoplasmic reticulum and use UDP glucuronic acid as a co-substrate for the formation of  $\beta$ -D-glucuronides (51).

UGT-mediated glucuronidation is the most important pathway for the human body's elimination of approximately 35% of all drugs metabolized by Phase II enzymes (52–54). It is also the major pathway for foreign chemical (dietary, environmental, pharmaceutical) removal for most drugs, dietary substances, toxins and endogenous substances (55, 56). Usually glucuronidation results in an inactive hydrophilic compound that inactivates and that can be readily excreted from the body via the urine or the bile (57); although there are some exceptions, such as morphine (58) and retinoic

acids (59) that are converted to pharmacologically active glucuronides.

UGTs are membrane bound enzymes localized in the endoplasmic reticulum of liver and extrahepatic tissues. Expression of these enzymes occurs in a tissue-specific manner, with many of the proteins expressed in the liver. However, some enzymes are exclusively expressed in specific extrahepatic tissues, such as the gastrointestinal tract, kidneys, and brain (55, 56, 60).

Genetic variations in specific *UGT* genes have been recognized and can be anticipated for all members of the UGT superfamily. The human UGT superfamily comprises two families (UGT1 and UGT2) based upon sequence relatedness and evolutionary divergence (61, 62). The UGT1 family of proteins is highly conserved in function and has been found in several vertebrates (63–66). The *UGT1A4* locus, located on chromosome 2q37.1, spans approximately 200 kb (67) and encodes at least nine functional UGT1A proteins (UGT1A1 and UGT1A3–10) and three non-functional exon 1 sequences (*UGT1A2*, *UGT1A11*, and *UGT1A12*) (68). Four exons are located at the 3' end of the *UGT1A* locus, which are combined with one of a consecutively numbered array of first exon cassettes toward the 5' end of the gene locus to form individual UGT gene products. Therefore, the amino terminal 280 amino acids of UGT1A proteins consists of unique exon 1 encoded sequence and the carboxyl terminal 245 amino acids encoded by exons 2–5 are identical (69, 70). The frequency of genetic variations in *UGT1A4* has been described for Caucasian, Korean and Japanese populations (71–76) (Table 2).

The *UGT1A4* gene is highly polymorphic and according to the UGT alleles nomenclature official page contains 109 SNPs (77). Among them, P24T (70C>A) and L48V (142T>G) exhibit a differential metabolic activity toward mutagenic amines and endogenous steroids, altering hepatic metabolism and detoxification (71, 72). Functional consequences of these SNPs in vitro were an enzyme activity being substrate dependent for P24T and a low activity of the enzyme carrying the L48V substitution (71, 72, 78).

### Pharmacogenetics of UGT and LTG: clinical implications

UGT1A4 exhibits catalytic activities mostly for primary and secondary amines that are present in various therapeutic drugs. Among these are a number of psychiatric drugs

**Table 2** Comparison of the main *UGT1A4* alleles in three different populations.

SNP	Amino acid change	Allele <sup>a</sup>	Asian, % <sup>b</sup> (n=256)	Caucasian, % <sup>c</sup> (n=100)	Caucasian, % <sup>d</sup> (n=254)
70C>A	P24T	<i>IA4*2</i>	0.0 <sup>d</sup> 1.0	6.0 15.0	4.9 20.9
142T>G	L48V	<i>IA4*3b</i>	12.9	8.0	8.3
471T>C	C157C	<i>IA4*1b</i>	1.0	15.0	20.9

<sup>a</sup>(77), <sup>b</sup>(73), <sup>c</sup>(72), <sup>d</sup>(53).

including imipramine, amitriptyline, trifluoperazine and LTG (56, 69).

Activity assays of UGT1A4 P24T and L48V showed reduced glucuronidation activities:  $\beta$ -naphthylamine 30% and 50%, and dihydrotestosterone 50% and 0%, respectively (72). A study in Koreans investigating the possible association of UGT1A4 polymorphisms with LTG induced rash found that the L48V c.142T>G polymorphism in the *UGT1A4* gene was not an important factor underlying LTG induced rash development, especially in the absence of P24T polymorphism (75).

It is important to mention that despite the fact that LTG is mainly metabolized by UGT1A4, there are other UGTs such as UGT1A1 and UGT2B7 contributing to LTG glucuronidation (22, 23). The minor contribution of UGT1A1 in LTG glucuronidation has been poorly investigated. One of the common genetic polymorphisms in *UGT1A* genes is a TA insertion in the *UGT1A1* TATA-box; 41 nucleotides upstream of the translation start site, leading to the variant (TA)<sub>7</sub> allele (*UGT1A1*\*28) instead of the (TA)<sub>6</sub> reference allele (*UGT1A1*\*1). This *UGT1A1* promoter region dinucleotide repeat polymorphism results in down-regulated levels by altering transcription initiation and also results in an approximately 70% reduction in glucuronidation of bilirubin and other UGT1A1 substrates (79). A number of studies have shown that *UGT1A1*\*28 is relatively frequent in many populations, with an allele frequency of 32%–39% in Caucasians, 40%–43% in Africans and 16%–18% in Asians (14, 22, 24, 25, 80, 81).

There are few studies analyzing *UGT2B7* gene polymorphisms in epileptic subjects. Several polymorphisms have been identified within the *UGT2B7* gene. The UGT2B7 protein is also found in the brain, kidney, pancreas, mammary gland, lung and gastrointestinal tract, and several additional tissues (80). The A to T transversion at nucleotide 802 leads to a change in amino acid sequence, H268T. This allele is designated as *UGT2B7*\*2 and their frequency is 48.9% and 26.8% in Caucasians and Asians, respectively (82). Allelic variants have also been identified in the *UGT2B7* promoter that exhibit some dependence on ethnicity haplotype distribution and appear to depend more on linkage to structural variants (82, 83). A haplotype defined by six promoter variants, involving –901G>A and –161T>C, was observed at a frequency between 44% and 55% in Caucasians and approximately 25% in Asians (73).

Although these genetic polymorphisms could alter the efficacy and adverse effects of AEDs, in most cases the functional significance of these SNPs is unclear. This could be due to a number of reasons: isozyme substrate specificity remains poorly defined, isoforms might exhibit overlapping substrate specificity or the domains of UGT proteins responsible for substrate binding are not identified (14, 24, 84). Moreover the UGT isozymes involved in the metabolism of each anticonvulsant are not yet well defined and some anticonvulsants can be metabolized by more than one isozyme (25).

Recently, Sánchez and collaborators analyzed the polymorphisms UGT2B7 161C>T and UGT2B7 372A>G and

their contribution to the interindividual variability in LTG concentration to dose ratio (LTG-CDR) in epileptic patients. A significant association was found between LTG-CDR and UGT2B7 –161C>T polymorphism, when patient age and concomitant AEDs were taken into account in a multivariate analysis (24).

## Conclusions and perspectives

In spite of all the studies on the pharmacogenetics of AEDs, the application of pharmacogenetic knowledge to clinical routine is limited in current practice.

To promote the application of pharmacogenetic knowledge in clinical routine, research on genotype based dose adjustments is still necessary, as is the promotion of faster and cheaper genotype analyses. Furthermore, the benefits of performing DNA genotyping to predict drug response and side effects should be evaluated in properly designed prospective pharmacogenetics trials.

For the use of PHT, the relevance of *CYP2C9* and *CYP2C19* must be also specifically considered, as well as for the use of LTG the relevance of *UGT1A4* and *UGT2B7* genetic polymorphisms.

In the near future, genetic factors should be considered when an antiepileptic drug is prescribed. Thus, personalized medicine could be of use for the treatment of epilepsy and help in achieving the dream of selecting the right drugs for the right patient at the right dosage. Although present information is not enough to fully personalize the treatment of epilepsy, there is sufficient available evidence to identify genetic risk factors related to lack of response or side effects. Therefore “stratified” medicine can be applied for improving the pharmacological treatment of epilepsy.

## Acknowledgments

This study was supported by Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i) and Fondo Social Europeo of the European Union (FEDER), Instituto de Salud Carlos III-FIS (CP06/0030 to P. Dorado), CIBERSAM and CAIBER, by Plan de Investigación Sanitaria en Extremadura, Consejería de Sanidad y Dependencia (FundeSalud PRIS10043) and AEXCID Cooperación Extremeña of the Junta de Extremadura (9IA006). This study was coordinated in the network Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (www.ribef.com).

## Conflict of interest statement

**Authors’ conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report or in the decision to submit the report for publication.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

## References

- Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis, International League against Epilepsy. *Epilepsia* 1993;34:592–6.
- Hauser WA, Beghi E. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia* 2008;49(Suppl 1):8–12.
- Sander JW, Shorvon SD. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:829–39.
- Kotsopoulos IA, van Merode T, Kessels FG, de Krom MC, Knottnerus JA. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures. *Epilepsia* 2002;43:1402–9.
- Stephen LJ, Brodie MJ. Selection of antiepileptic drugs in adults. *Neurol Clin Epilepsy* 2009;27:967–92.
- Leeman BA, Cole AJ. Advancements in the treatment of epilepsy. *Annu Rev Med* 2008;59:503–23.
- Sillanpää M, Schmidt D. Natural history of treated childhood onset epilepsy: prospective, long term population based study. *Brain* 2006;129:617–24.
- Basic S, Hajnšek S, Božina N, Filipčić I, Sporiš D, Mišlov D, Posavec A. The influence of C3435T polymorphism of ABCB1 gene on penetration of phenobarbital across the blood-brain barrier in patients with generalized epilepsy. *Seizure*, 2008;17:524–530.
- Beghi E. Treating epilepsy across its different stages. *Ther Adv Neurol Disord* 2010;3:85–92.
- Holland KD. Efficacy, pharmacology, and adverse effects of antiepileptic drugs. *Neurol Clin* 2001;19:313–45.
- Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2009;50:1–23.
- Kalow W, Tang BK, Endreyani L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998;8:283–9.
- Anderson GD. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic targeted therapy of antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 2008;30:173–80.
- Saruwatari J, Ishitsu T, Nakagawa K. Update on the genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes in antiepileptic drug therapy. *Pharmaceuticals* 2010;3:2709–32.
- McDonagh M, Peterson K, Lee N, Thakurta S. Drug class review: antiepileptic drugs for indications other than epilepsy. Portland, OR: Oregon Health & Science University, 2008.
- Krasowski MD. Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;3:1909–35.
- Leach MJ, Marden CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia* 1986;27:490–7.
- Cheung H, Kamp D, Harris E. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. *Epilepsy Res* 1992;13:107–12.
- French JA, Kanner AM, Bautista J, Abou-Khalil B, Browne T, Harden CL, et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new onset epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology* 2004;62:1252–60.
- Beghi E. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs: comparison of two recent guidelines. *Lancet Neurol* 2004;3:618–21.
- Liston HL, Markowitz JS, DeVane CL. Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:500–15.
- Rowland A, Elliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG, Miners JO. In vitro characterization of lamotrigine N2-glucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1055–62.
- Magdalou J, Herber R, Bidault R, Siest G. In vitro N-glucuronidation of a novel antiepileptic drug, lamotrigine, by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;260:1166–73.
- Sánchez M, Herranz JL, Leno C, Arteaga R, Oterino A, Valdizán EM, et al. UGT2B7<sub>-161C>T</sub> polymorphism is associated with lamotrigine concentration to dose ratio in a multivariate study. *Ther Drug Monit* 2010;32:177–84.
- Sánchez MB, Herranz JL, Leno C, Arteaga R, Oterino A, Valdizán EM, et al. Genetic factors associated with drug-resistance of epilepsy: relevance of stratification by patient age and aetiology of epilepsy. *Seizure* 2010;19:93–101.
- Wong IC, Lhatoo SD. Adverse reactions to new anticonvulsant drugs. *Drug Saf* 2000;23:35–56.
- Llerena A, Dorado P, Peñas-Lledó EM. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics* 2009;10:17–28.
- Kirchheiner J, Seeringer A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:489–94.
- Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Updated September 8, 2008. Accessed 22 February, 2011. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se/index.html>.
- Yang ZF, Cui HW, Hasi T, Jia SQ, Gong ML, Su XL. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Mongolian population in China. *Genet Mol Res* 2010;9:1844–51.
- Dorado P, Berecz R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, Llerena A. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:221–5.
- LLerena A, Dorado P, O’Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML. Lower frequency of CYP2C9\*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2004;4:403–6.
- Dorado P, Sosa-Macias MG, Peñas-Lledó EM, Alanis-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, et al. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2011;11:108–112.
- Taguchi M, Hongou K, Yagi S, Miyawaki T, Takizawa M, Aiba T, et al. Evaluation of phenytoin dosage regimens based on genotyping of CYP2C subfamily in routinely treated Japanese patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:107–12.
- Kubota T, Chiba K, Ishizaki T. Genotyping of S-mephenytoin 4’-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:661–6.
- Giancarlo GM, Venkatakrisnan K, Granda BW, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Relative contributions of CYP2C9 and 2C19 to phenytoin 4-hydroxylation in vitro: inhibition by sulfaphenazole, omeprazole, and ticlopidine. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:31–6.
- Bajpai M, Roskos LK, Shen DD, Levy RH. Roles of cytochrome P450 2C9 and cytochrome P450 2C19 in the stereo selective metabolism of phenytoin to its major metabolite. *Drug Metab Dispos* 1996;24:1401–3.
- Hennessy S, Freeman CP, Metlay JP, Chu X, Strom BL, Bilker WB. CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1 genotype and hospitalization for phenytoin toxicity. *J Clin Pharmacol* 2009;49:1483–7.

39. Hung CC, Lin CJ, Chen CC, Chang CJ, Liou HH. Dosage recommendation of phenytoin for patients with epilepsy with different CYP2C9/CYP2C19 polymorphisms. *Ther Drug Monit* 2004;26:534–40.
40. Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro N. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. *Ther Drug Monit* 2000;22:230–2.
41. Brandolese R, Scordo MG, Spina E, Gusella M, Padrini R. Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9\*3. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:391–4.
42. Lee AY, Kim MJ, Chey WY, Choi J, Kim BG. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:155–9.
43. Soga Y, Nishimura F, Ohtsuka Y, Araki H, Iwamoto Y, Naruishi H, et al. CYP2C polymorphisms, phenytoin metabolism and gingival overgrowth in epileptic subjects. *Life Sci* 2004;74:827–34.
44. Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Güzelbey P, Ongen Z, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409–15.
45. Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, Uwai Y, Hattori H, Furusho K, et al. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:287–92.
46. Tate SK, Depondt CH, Sisodiya SM, Cavalleri GL, Schorge S, Soranzo N, et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the antiepileptic drug carbamazepine and phenytoin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5507–12.
47. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79:103–13.
48. Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006;44:297–302.
49. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;121:512–8.
50. Goldstone JV, Hamdoun A, Cole BJ, Howard-Ashby M, Nebert DW, Scally M, et al. The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev Biol* 2006;300:366–84.
51. Dutton GJ, Storey ID. The isolation of a compound of uridine diphosphate and glucuronic acid from liver. *Proc Biochem Soc* 1953;53:37–8.
52. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, et al. Drug-drug interactions for UDP-Glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCI/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1201–8.
53. Ménard V, Girard H, Harvey M, Pérusse L, Guillemette C. Analysis of inherited genetic variations at the UGT1 locus in the French-Canadian population. *Hum Mutat* 2009;30:677–87.
54. Bock KW, Köhle C. Topological aspects of oligomeric UDP-glucuronosyltransferases in endoplasmic reticulum membranes: advances and open questions. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1458–65.
55. King C, Rios G, Green M, Tephly T. “UDP-glucuronosyltransferases”. *Curr Drug Metab* 2000;1:143–61.
56. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:581–616.
57. Vore M, Hadd HS, Slikker W Jr. Ethynylestradiol-17 beta D-ring glucuronide conjugates are potent cholestatic agents in the rat. *Life Sci* 1983;32:2989–93.
58. Shimomura K, Kamata O, Ueki S, Ida S, Oguri K. Analgesic effect of morphine glucuronides. *Tohoku J Exp Med* 1971;105:45–52.
59. Formelli F, Barua AB, Olson JA. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 1996;10:1014–24.
60. Hahn KK, Wolff JJ, Kolesar JM. Pharmacogenetics and irinotecan therapy. *Am J Health Syst Pharm* 2006;63:2211–7.
61. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997;7:255–69.
62. Burchell B, Brierley CH, Monaghan G, Clarke DJ. The structure and function of the UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Adv Pharmacol* 1998;42:335–8.
63. Iyanagi T, Watanabe T, Uchiyama Y. The 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase deficiency in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat) is caused by a -1 frameshift mutation. *J Biol Chem* 1989;264:21302–7.
64. Iyanagi T. Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat). *J Biol Chem* 1991;266:24048–52.
65. Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J Biol Chem* 1992;267:3257–61.
66. Li Q, Lamb G, Tukey RH. Characterization of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in lagomorphs: evidence for duplication of the UGT1A6 gene. *Mol Pharmacol* 2000;58:89–97.
67. Harding D, Jeremiah SJ, Povey S, Burchell B. Chromosomal mapping of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase, GNT1. *Ann Hum Genet* 1990;54:17–21.
68. Zhang T, Haws P, Wu Q. Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Res* 2004;14:79–89.
69. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Oberer-Straub P, Barut A, Tukey RH, et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 2000;275:36164–71.
70. Starlard-Davenport A, Lyn-Cook B, Beland FA, Pogribny IP. The role of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters in breast cancer drug resistance. *Exp Oncol* 2010;32:172–80.
71. Wiener D, Fang JL, Dossett N, Lazarus P. Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes. *Cancer Res* 2004;64:1190–6.
72. Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 2004;39:970–7.
73. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, et al. Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:144–51.
74. Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005;33:672–5.



75. Kim DW, Kim M, Lee SK, Kang R, Lee SY. Lack of association between L48V polymorphism in the UGT1A4 gene and lamotrigine-induced rash. *J Korean Epilepsy Soc* 2006;10:31–4.
76. Benoit-Biancamano MO, Adam JP, Bernard O, Court MH, Leblanc MH, Caron P, et al. A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:945–54.
77. UGT Alleles Nomenclature Home Page. UGT Nomenclature Committee. June 2005. Accessed 22 February, 2011. Available at: <http://www.ugtalleles.ulaval.ca>.
78. Court MH. Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metab Rev* 2010;42:202–17.
79. Glubb DM, Innocenti F. Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2011;3:299–313.
80. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP glucuronosyltransferase. *Pharmacogenomics J* 2003;3:136–58.
81. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, et al. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics* 2000;10:679–85.
82. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Ozawa S, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1048–54.
83. Hines RN, Koukouritaki SB, Poch MT, Stephens MC. Regulatory polymorphisms and their contribution to interindividual differences in the expression of enzymes influencing drug and toxicant disposition. *Drug Metab Rev* 2008;40:263–301.
84. Guillemette C, Levesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* 2010;42:22–42.

# CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population

Pedro Dorado · Natalia Heras · Esther Machín ·  
Francisco Hernández · Enrique Teran · Adrián LLerena

Received: 17 June 2011 / Accepted: 14 October 2011  
© Springer-Verlag 2011

## Abstract

**Purpose** Cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) genotypes and the dextromethorphan/dextrorphan (DXM/DXT) metabolic ratio (MR), which is a marker of *CYP2D6* activity, were studied in 118 unrelated healthy Ecuadorians.

**Methods** Genotyping of *CYP2D6* was performed by amplification of entire *CYP2D6* gene by XL-PCR for *CYP2D6*\*5 and multiplication alleles and by real time-PCR for *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35, \*41, and copy number. The plasma levels of DXM and its metabolite DXT were determined on a high-performance liquid chromatography–UV system.

**Results** The proportions of non-functional alleles were 0.4, 10.6, 0.8, 2.1, and 0% for *CYP2D6*\*3, \*4, \*4×N, \*5, and \*6, respectively. Genotypically, only one of the subjects

(0.9%) was homozygous for two inactive alleles and phenotypically classified as a poor metabolizer (PM). The MRs (mean ± standard deviation) corresponding to “activity scores” of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5 were 10.57 ( $n=1$ ),  $1.63 \pm 0.35$  ( $n=2$ ),  $1.16 \pm 0.74$  ( $n=29$ ),  $1.00 \pm 0.47$  ( $n=8$ ),  $1.24 \pm 0.82$  ( $n=76$ ), and  $1.30 \pm 0.32$  ( $n=2$ ), respectively.

**Conclusions** Our data suggest that only 1% of subjects of this Ecuadorian population were PMs and that none were phenotypically ultrarapid metabolizers, which is in agreement with previous findings in other Amerindian populations.

**Keywords** CYP2D6 · Dextromethorphan · Ecuador · Pharmacogenetics

P. Dorado · E. Machín · A. LLerena  
CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University  
Hospital and Medical School,  
Badajoz, Spain

N. Heras · E. Teran  
Biomedical Centre, Central University of Ecuador,  
Quito, Ecuador

F. Hernández  
School of Medicine, Universidad Estatal de Guayaquil,  
Guayaquil, Ecuador

E. Teran (✉)  
Health Science College, Universidad San Francisco de Quito,  
Quito, Ecuador  
e-mail: e\_teran\_uce@hotmail.com

A. LLerena (✉)  
SES Servicio Extremeño de Salud,  
Hospital Universitario Infanta Cristina, University of Extremadura,  
06080 Badajoz, Spain  
e-mail: allerena@unex.es  
URL: [www.ribef.com](http://www.ribef.com)

## Introduction

As one of the cytochrome P450 (CYP) system of enzymes, *CYP2D6* is involved in the metabolism of many widely used drugs [1]. The *CYP2D6* gene, located on chromosome 22q13.1, is highly polymorphic, with alleles causing absent (poor metabolizers or PMs), reduced, normal (extensive metabolizers or EMs), and increased (ultrarapid metabolizers or UMs) catalytic activity [2]. Inter-ethnic differences in such cytochrome P450 polymorphism might be partially responsible for the variations in drug disposition between populations [3]. Alleles encoding no, reduced, normal, and increased catalytic activity, respectively, lead to a wide range of individual *CYP2D6* activity within a population.

Although *CYP2D6* genotyping is widely used to evaluate *CYP2D6* enzyme activity, the *CYP2D6* metabolic capacity can only be determined by assessing the results of a phenotyping test involving a specific drug, such as dextromethorphan (DXM), debrisoquine, metoprolol, tramadol, or sparteine [3]. Most studies have preferred DXM due to its

availability and wide safety margin. The standard approach for phenotyping human CYP2D6 is to determine the DXM/dextrorphan (DXT) metabolic ratio (MR) in a 4- to 8-h urine sample [4]. Although urine sampling is less invasive, a 3-h plasma sample may represent a good alternative in term of speed and accuracy [4, 5] for determining the MR, especially if combined with genotyping.

The population of Ecuador comprises mostly a mixture of ancient Amerindians and Spaniards. Economic factors have led Ecuadorians to leave Ecuador for other countries, and they currently form a large part of the Latino population in the USA and Europe, particularly in Spain. There are few studies addressing the relationship between CYP2D6 genotypes and hydroxylation phenotypes in Hispanic and Latino-American populations in general [6, 7]. Indeed, the relationship between phenotype and genotype has never been studied in a mestizo population of Ecuador.

Therefore, the aim of our study was to analyze the frequency of CYP2D6 alleles and the DXM hydroxylation phenotype in a group of healthy Ecuadorian volunteers.

## Materials and methods

### Subjects

The study population comprised 118 unrelated healthy individuals (58% women; mean age  $25 \pm 8.5$  years), most of whom were students at the Central University of Ecuador. Their home residence was situated in different regions of Ecuador, with 59% ( $n=70$ ) residing in Quito (2,800 m a.s.l.), 19% ( $n=22$ ) in Cuenca (970 km south of Quito), and 5% ( $n=6$ ) in Tulcan (430 km north of Quito), all located in the Andean region, and the remaining 17% ( $n=20$ ) residing in Guayaquil (22 m a.s.l.) on the Pacific coast. In terms of ethnicity, all subjects were defined as mestizo (a mix of Spanish and Andean populations)

The study was performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki for human experimental research. All participants gave written informed consent, and approval was obtained from the Bioethics Committee of the Central University of Ecuador.

### Phenotyping

To evaluate individual CYP2D6 hydroxylation capacity, each participant, after having fasted for at least 8 h, was given a single oral dose of 30 mg of DXM (Laboratorios HG, Guayaquil, Ecuador). A blood sample was taken for analysis 3 h after the dose had been administered. Plasma was separated from the red blood cells prior to storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and the frozen samples

were transported from Quito (Ecuador) to Badajoz (Spain) for analysis.

Plasma concentrations of DXM and DXT were determined by means of a high-performance liquid chromatography (HPLC) analytical procedure with UV detection. The liquid chromatography system consisted of a Beckman Coulter Model System Gold 118 Solvent Module pump, a Beckman 166 programmable detector module, and a Rheodyne Model 7725i injector (Beckman Instruments, Fullerton, CA), loop volume 20  $\mu\text{l}$ , coupled to a PC with Beckman 32 Karat software ver. (Beckman Instruments). The analytical column (250 $\times$ 4.6 mm, internal diameter 5  $\mu\text{m}$ ) was packed with ACE 5 phenyl (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland).

The mobile phase was a mixture of 10 mM potassium dihydrogen phosphate (adjusted to pH 4 with orthophosphoric acid) and acetonitrile (60:40 v/v). Prior to assay, the mobile phase was filtered through a 0.22-mm polyamide filter (Millipore, Bedford, MA) and degassed ultrasonically for 15 min. The flow rate was set to 1 ml/min and the detection wavelength to 221 nm. HPLC-grade acetonitrile, methanol, hexane, potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), diisopropyl ether, and orthophosphoric acid were from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Analytical reagent grade hydrochloric acid and sodium hydroxide were from Panreac (Barcelona, Spain).

Sample preparation was carried out by liquid–liquid extraction. A 1-ml aliquot of human plasma was pipetted into a 10-ml polypropylene tube and alkalized with 100  $\mu\text{l}$  of 28% aqueous sodium hydroxide. The plasma was extracted with 2 ml of hexane:diisopropyl ether (80:20, v/v) after the addition of 20  $\mu\text{l}$  of the internal standard working solution (levallorphan 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; IS). The tubes were capped, shaken vertically for 10 min., and then centrifuged for 10 min. at 1,000  $g$ . The organic layer was transferred to another tube for back-extraction with 150  $\mu\text{l}$  of 0.01 M hydrochloric acid, vortex-mixed for 5 min, and centrifuged for 10 min at 1,000  $g$ . The upper organic layer was aspirated off, and the remaining organic phase was evaporated under nitrogen flow for 30 min. A 20- $\mu\text{l}$  aliquot of the acidic solution was injected into the HPLC system for assay.

The validation results were as follows. Linearity was evaluated in the range 20–1,000 ng/ml for both analytes (DXM and DXT). Calibration curves were determined in triplicate, using seven concentrations between 20 and 1,000 ng/ml, and found to be linear for all concentrations of the two compounds within this concentration range ( $r^2 > 0.98$ ).

The recovery was calculated by comparing the peak heights after the injection of DXM and DXT dissolved in the mobile phase, with the peak heights obtained after

extraction of the same amount of the compounds from plasma. Sample extraction and subsequent HPLC analysis were carried out as described above. The mean recoveries for DXM and DXT calculated at three different concentrations (20, 500 and 1,000 ng/ml) were 99.1 and 95.7%, respectively.

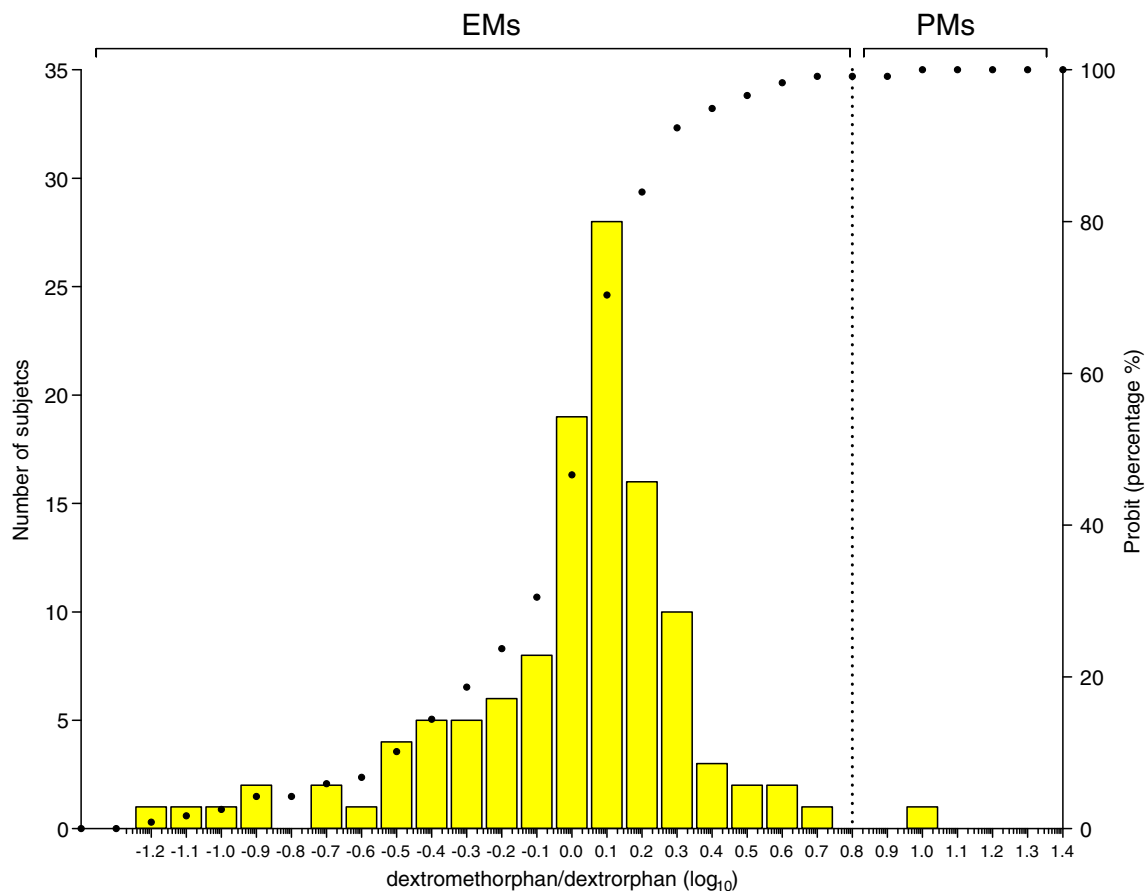
The intra-assay and inter-day precision and accuracy were evaluated by analyzing blank plasma samples spiked with different amounts of DXM and DXT and subsequently calculating their concentrations with a standard curve analyzed on the same day. The inter-day assay variance was determined on 1-ml aliquots of spiked plasma samples containing DXM and DXT on different days. The inter-day and intra-day coefficients of variation were <10%.

The quantification limits were 10 and 15 ng/ml for DXM and DXT, respectively, and the detection limit was 5 ng/ml for both analytes.

### Genotyping

For the genotyping, 5-ml aliquots of blood were collected in EDTA tubes, and DNA was extracted using the QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

To detect the presence of allelic variants harboring a *CYP2D6\*5* gene deletion or gene duplication, long range (XL)-PCR was performed as described in detail elsewhere [8]. Subjects positive for a duplication were further characterized for gene copy number. Genotype analysis for the *CYP2D6\*2*, \*3, \*4,\*6, \*10, \*17, \*29, \*35, and \*41 allelic variants was carried out on genomic DNA using the commercially available TaqMan assay. The *CYP2D6* genotype was determined based on the presence of “key” single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the alleles of interest (−1,584 C>G, 31 G>A, 100 C>T, 1,023 C>T, 1,707 T>del, 1,846 G>A, 2,549A>del, 2,988 G>A, 3,183 G>A, and 4,180 G>C) as previously described [2]. *CYP2D6\*2* alleles were defined by the presence of −1,584 C>G and 2,850 C>T and *CYP2D6\*35* alleles by the presence of −1,584 C>G and 31 G>A; none of the subjects appeared to carry *CYP2D6\*2* alleles that lacked the −1,584 C>G SNP. To discriminate between the *CYP2D6\*1xN*, \*2xN, and \*4xN alleles, we generated a 10-kb long XL-PCR fragment from duplication-positive subjects and tested these for the respective SNPs by an established PCR–restriction fragment length polymorphism approach [8].



**Fig. 1** Histogram of dextromethorphan/dextrorphan metabolic ratios (MRs) in 3-h plasma samples obtained from 118 healthy Ecuadorian subjects. *Dotted lines* Poor metabolizers (PMs; log<sub>10</sub>MR >0.8), *dotted curve* accumulative frequencies. *EMs* Extensive metabolizers



Real time-PCR genotyping was carried out using Taqman and CYP2D6 CopyNumber assays (Hs00010001\_cn; Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions, including specific primers and probes for these polymorphisms, and the Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, which contains AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTP, buffers, and passive internal reference based on the ROX reference dye (Invitrogen, Carlsbad, CA). The amplification conditions consisted of a 10-min pre-incubation at 95°C to activate the Taq DNA polymerase, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and then by primer annealing and extension for 1 min at 60°C. All assays were carried out in 96 well plates, with each plate including negative (without DNA) and positive (heterozygous and/or homozygous) controls. The genotypes used as the positive controls had been obtained during previous studies by our group. Plates were read on an ABI 7,300 instrument (Applied Biosystems). Hs00010001\_cn specifically targets CYP2D6 exon 9 sequences and will not amplify CYP2D7 or CYP2D8 pseudogenes, or CYP2D6 alleles having CYP2D7 sequences in exon 9 (e.g., CYP2D6\*36).

The relationship between CYP2D6 genotype and MR was evaluated using the "activity score" [7, 9]. A value of 1 was assigned to the reference allele CYP2D6 \*1, \*2, and \*35, a value of 0 to CYP2D6\*3, \*4, \*4×N, \*5, and \*6, a value of 0.5 to CYP2D6\*10, \*17, \*29, and \*41, and a value of 2 to multiplications of active CYP2D6 (\*1×N or \*2×N).

### Statistical analysis

Analyses of inter-individual variations in the MR were expressed by a probit plot and a frequency distribution histogram of the number of the subjects versus log<sub>10</sub> MR. Antimode was determined by linear regression from the probit plot. The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the MR distribution. Correlations between "activity scores" and MRs were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. Mean MRs for different "activity scores" were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test for multiple comparisons. *P* values of <0.05 were regarded as being statistically significant. The statistical analyses were performed using the STATISTICA ver. 4.3 (StatSoft, Tulsa, OK) and GraphPad Prism ver. 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA) computer programs.

### Results

The MR histograms revealed a bimodal distribution of CYP2D6 activity in this population (Fig. 1). DXM and DXT were quantified using the protocol and the analytical

method described above. The Shapiro–Wilk normality test of the MR values indicated that they were drawn from a non-normal distribution. Considering the probit plot and based on a visual inspection of the frequency distribution, a cut-off value of 0.8 (log<sub>10</sub>) was used to separate PMs and EMs. Applying this cut-off value, one subject [0.9%, 95% confidence interval (CI) 0.01–5.11] was classified as a PM, and the remaining 117 were classified as EMs. No differences in any of the variables analyzed, such as gender, age, tobacco smoking, and caffeine consumption, were found. In addition, the population was healthy and presented a similar life-style and nutritional habits.

The CYP2D6 genotype and allele frequencies for this healthy Ecuadorian population are given in Tables 1 and 2. One of the subjects was classified as PM (0 active genes), and no UMs (≥3 active genes) were found, although 2.6% of the study population were classified as presenting an "activity score" of 2.5 (Table 1). The frequency of functional CYP2D6 alleles (\*1, \*2, \*35) was 80.1%, whereas the frequencies of reduced (\*10, \*17, \*29, \*41), null (\*3, \*4, \*5, \*6, \*4×N), and "hypothetically" increased (\*1×N, \*2×N) functional alleles were 5.1, 14, and 0.8%, respectively (Table 2).

The frequency of null alleles (\*3, \*4, \*4×N, \*5, \*6) in our study population (14%) was similar to that found in

**Table 1** Frequencies of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotypes in an Ecuadorian population (*n*=118)

Genotype	Activity score	Number	Frequency
*4/*4	0	1	0.008
*4/*10	0.5	1	0.008
*5/*41	0.5	1	0.008
*2/*4	1	10	0.085
*2/*4x2	1	1	0.008
*1/*4x2	1	1	0.008
*2/*5	1	2	0.017
*1/*3	1	1	0.008
*1/*4	1	12	0.102
*1/*5	1	2	0.017
*2/*41	1.5	2	0.017
*2/*17	1.5	1	0.008
*1/*10	1.5	2	0.017
*1/*41	1.5	1	0.008
*1/*29	1.5	1	0.008
*2/*29	1.5	1	0.008
*1/*1	2	30	0.254
*1/*2	2	33	0.280
*2/*2	2	11	0.093
*2/*35	2	2	0.017
*2x2/*41	2.5	1	0.008
*1x2/*41	2.5	1	0.008

**Table 2** Percentages of *CYP2D6* variant alleles and poor metabolizers in the Ecuadorian population ( $n=118$ ) of this study and in Latino, Amerindian, and Spanish populations previously studied

Populations	Number of subjects	Non-functional alleles				Reduced activity alleles		Mult. <sup>a</sup>	Mult. of functional alleles	Mult. of non-functional alleles	Percentage of PMs <sup>b</sup>	Reference
		*3	*4	*5	*6	*10	*17					
Brazilian-African	87	1.2	6.3	4.2	0	4.2	9.2		2.3	1.2		[17]
	92	0	10.3	1.1	2.2	2.7	2.2		4.9	1.6		[17]
Colombian	121	1.2	19.4	0.8	0		1.6	1.2				[18]
Cuban-Mestizo	126											[7]
	129										3.9 (dbq)	[7]
Cuna (Panama)	170										0 (spt)	[10]
	89										0 (dbq)	[19]
Embera (Panama, Colombia)	153	0	14	0	1.1	6.9						[19]
	153										2.2 (spt)	[19]
Mapuche (Chile)	84	0	3.6	4.2		1.8						[14]
Mexican-American	349	<1	10.3	2.3		7.4	<1	1				[20]
	285										3.2 (dxt)	[20]
	264	0.2	10	1.7	0.4	2.8	0.2	0.8				[21]
	236										10 (dxt)	[21]
	50		17	2		1	2	3				[22]
	50										6 (dxt)	[22]
Mexican-Mestizo	243	1.4	11.2	2.7		12.4	1.7	12.8				[23]
	100										10 (dxt)	[23]
	110	0.9	13.1		0	2.3						[11]
	88										6.8 (dxt)	[11]
Ngawbe (Panama, Colombia)	344	0	17.1	0	0.5	17.5						[19]
	344										4.4 (spt)	[19]
Nicaraguan-Mestizo	98											[7]
	133										6.0 (dbq)	[7]
Spanish	925										5.2 (dbq)	[24]
	327	0.5	18.5	1.4	3.1	2.0	0		4.1	0.3		[7]
Tepehuano (Mexico)	85	0	0.6		0	0						[11]
	58										0 (dxt)	[11]
Uruguayan	302										7.3 (dxt)	[25]
White-Cuban	130	0	14.6	1.9	0.8	0.4	2.7		3.8	0.4		[7]
	131										5.3 (dbq)	[7]
Ecuadorian (this study)	118	0.4	10.6	2.1	0	1.3	0.4	0.8+0.8			0.9 (dxt)	

<sup>a</sup> Mult, Multiplications of functional plus non-functional *CYP2D6* alleles (not specified)

<sup>b</sup> Percentage of *CYP2D6* poor metabolizers (PMs) determined using a specific phenotyping test drug: dbq, debrisoquine; dxt, dextromethorphan; spt, sparteine

other studies in other Hispanic populations (11–20%), but higher than that reported in Chilean Mapuches (7.8%) and Mexican Tepehuanos (1.1%). Among the latter two populations, the most frequent allele was *CYP2D6*\*4 (10.6%; Table 2).

The frequencies of alleles with reduced activity (\*10, \*17, \*29, \*41) in this study (5.1%) were similar to those reported in European populations, but lower than those in some

Amerindian and African-American populations (11–17.5%; Table 2). Among these, *CYP2D6*\*10 and \*41 were the most frequent (1.3 and 2.2%, respectively; Table 2). The frequency of duplication/multiplication of active *CYP2D6* alleles (1.2%) was also similar to values reported for other South American and Amerindian populations (0–1%), including Nicaraguans, but lower than those reported for White-European populations (3–5%) (Table 2).

The mean  $\pm$  standard deviation ( $n$ ) values of the MR among the 118 healthy volunteers with an “activity score” of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5 were 10.57 ( $n=1$ ),  $1.63\pm 0.35$  ( $n=2$ ),  $1.16\pm 0.74$  ( $n=29$ ),  $1.00\pm 0.47$  ( $n=8$ ),  $1.24\pm 0.82$  ( $n=76$ ), and  $1.30\pm 0.32$  ( $n=2$ ), respectively. The subject with the highest DXM/DXT ratio (MR 10.57;  $\log_{10}\text{MR}=1.02$ ) carried two copies of the inactive allele *CYP2D6*\*4 (Fig. 2).

In this study, no differences were found in the phenotype or genotype frequencies between subjects from different geographical regions.

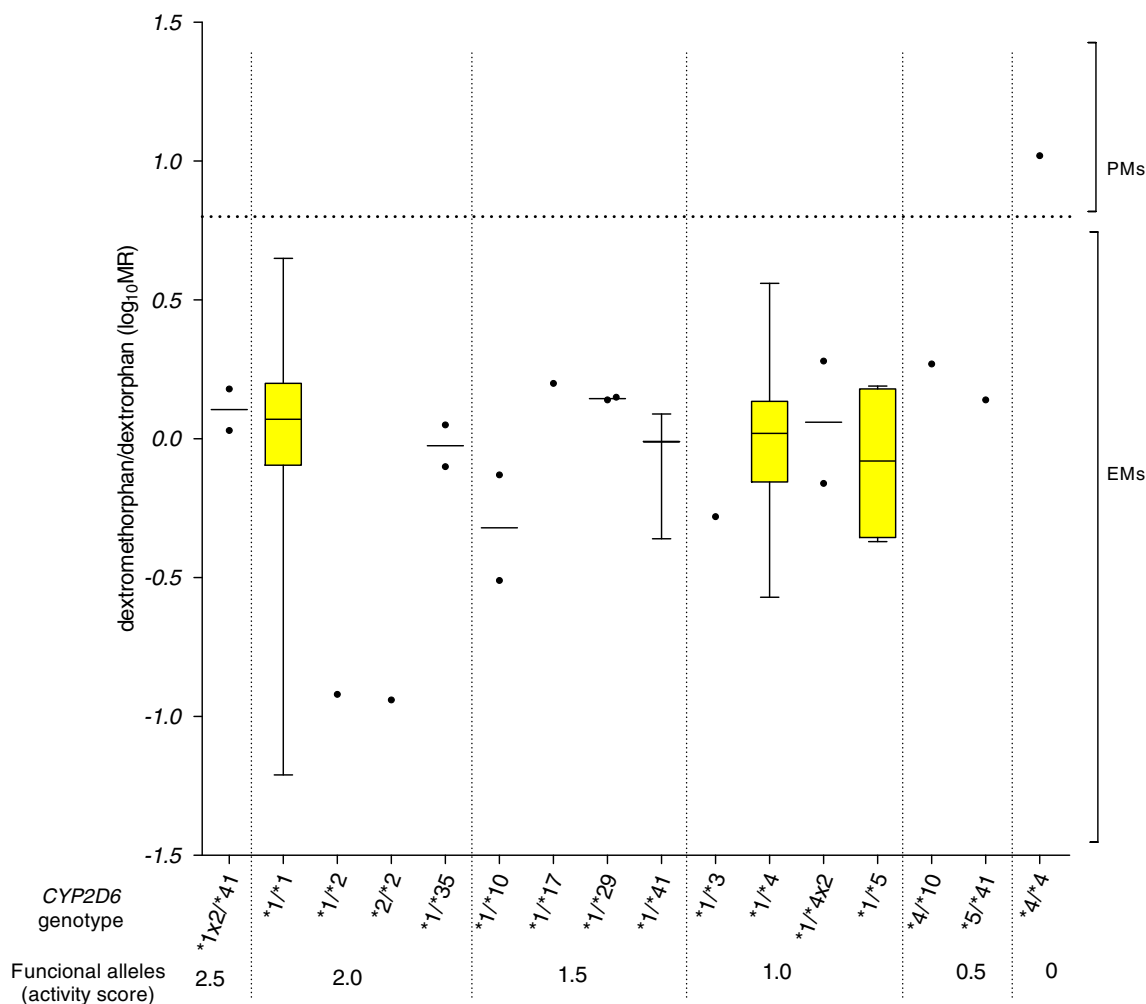
## Discussion

This is the first study in an Ecuadorian population reporting the distribution of *CYP2D6* phenotypes and genotypes. The low frequency (<1%) of individuals who are phenotypically PMs is consistent with the absence of PMs described in a

number of previously studied Amerindian populations, such as Cunas [10] and Tepehuanos [11].

In this study, a cut-off value of 6.3 ( $\log_{10}=0.8$ ) was used to separate PMs and EMs, chosen on the basis of the probit plot and visual inspection of the frequency distribution histogram (Fig. 1). Tamminga et al. [5] suggested the suitability of using the DXT/DXM MR of 3-h plasma samples, and the antimode differentiating PMs from EMs was calculated to be 2.0 [12]. Differences between these two antimodes may be due to analytical methods, since we used a non-deconjugation method similar to that reported in a previous study [13]. In our study, despite the inherent limitation associated with using a non-deconjugation analytical method, the only individual detected as being phenotypically a PM was also confirmed to be genotypically a PM.

The frequency of null alleles (\*3, \*4, \*4*N*, \*5, \*6) in this study was higher than that in Chilean Mapuches [14] and Mexican Tepehuanos [15] (Table 2). Moreover, the



**Fig. 2** Relationship between dextromethorphan/dextrorphan metabolic ratios in 3-h plasma samples and *CYP2D6* genotypes among the 118 healthy Ecuadorian study subjects. Dotted line PMs ( $\log_{10}\text{MR} > 0.8$ ), boxes: mean, maximum, and minimum

frequency of reduced function alleles (\*10, \*17, \*29, \*41) in this population was similar to that reported in European populations, but lower than that in some Amerindian and African-American populations, and the frequency of duplication/multiplication of active *CYP2D6* alleles was similar to the values reported for other South American and Amerindian populations (Table 2). Therefore, it would appear that there is an African mixture in this population.

Pharmacogenetics will allow drug individualization and also the development of regional drug recommendations according to ethnic and cultural factors. Several studies have shown that genetic differences between individuals are higher than those between ethnic groups or races [16]. Therefore, with respect to individualizing the treatment of any given patient, the better approach would be to consider an individual- rather than an ethnic-based approach. However, in terms of public health care, population pharmacogenetics may be useful for the optimization of recommended drug dosages for a given ethnic group, with the aim of preventing side effects or therapeutic failures.

## Conclusions

The prevalence of PMs in the Ecuadorian population studied here was about 1%. None of the subjects were UMs. These findings are in agreement with those reported previously on Amerindian populations and demonstrate the differences among these populations and other ethnic populations due to the absence and low frequency of *CYP2D6* UMs and PMs, respectively. Thus, within the framework of public health care, further research on ethnic groups in America is warranted in order to improve current drug-dosing recommendations and prevent side effects and therapy failures.

**Acknowledgments** The technical assistance of Inés López and Beatriz Grillo is gratefully acknowledged. We also thank to Eva M. Peñas-Lledó PhD for her fruitful comments and review. This study was partially funded by AEXCID Cooperación Extremeña of Junta de Extremadura (9IA006) and coordinated in the RIBEF network (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica; [www.ribef.com](http://www.ribef.com)). It was also partly supported by the Institute of Health Carlos III-FIS and European Union (FEDER) Grants PI10/02758, PI10/02010, and CP06/00030 (P. Dorado).

**Conflict of interest statement** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5:6–13
2. *CYP2D6* allele nomenclature. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>. Accessed 17 June 2011
3. LLerena A, Dorado P, Peñas-Lledó EM (2009) Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for *CYP2D6* hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics* 10:17–28
4. Frank D, Jaehde U, Fuhr U (2007) Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for *CYP2D6* phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol* 63:321–333
5. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Brakenhoff JP, Gerrits MG, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH (2001) An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on *CYP2D6* and *CYP2C19*. *Eur J Clin Pharmacol* 57:143–146
6. Dorado P, Suarez-Kurtz G, LLerena A (2007) Pharmacogenetics of cytochrome P450 in Hispanic populations. In: Suarez-Kurtz G (ed) *Pharmacogenomics in admixed populations*. Landes Bioscience, Austin, pp 60–74
7. LLerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Alvarez M, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Calzadilla LR (2010) *CYP2D6* genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J*. doi:10.1038/tpj.2010.85
8. Dorado P, Cáceres M, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J, LLerena A (2005) Development of a PCR-based strategy for *CYP2D6* genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques* 39[10 Suppl]:S571–S574
9. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS (2008) The *CYP2D6* activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 83:234–242
10. Arias TD, Jorge LF, Lee D, Barrantes R, Inaba T (1988) The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama: absence of evidence for deficient metabolizers. *Clin Pharmacol Ther* 43:456–465
11. Sosa-Macías M, Elizondo G, Flores-Pérez C, Flores-Pérez J, Bradley-Alvarez F, Alanis-Bañuelos RE, Lares-Asseff I (2006) *CYP2D6* genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico. *J Clin Pharmacol* 46:527–536
12. Yeh GC, Tao PL, Ho HO, Lee YJ, Chen JY, Sheu MT (2003) Analysis of pharmacokinetic parameters for assessment of dextromethorphan metabolic phenotypes. *J Biomed Sci* 10:552–564
13. Chládek J, Zimová G, Beránek M, Martínková J (2000) In-vivo indices of *CYP2D6* activity: comparison of dextromethorphan metabolic ratios in 4-h urine and 3-h plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 56:651–657
14. Muñoz S, Vollrath V, Vallejos MP, Miquel JF, Covarrubias C, Raddatz A, Chianale J (1998) Genetic polymorphisms of *CYP2D6*, *CYP1A1* and *CYP2E1* in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics* 8:343–351
15. Sosa-Macías M, Dorado P, Alanis-Bañuelos RE, LLerena A, Lares-Asseff I (2010) Influence of *CYP2D6* deletion, multiplication, –1584 C>G, 31 G>A and 2988 G>A gene polymorphisms on dextromethorphan metabolism among Mexican tepehuanos and mestizos. *Pharmacology* 86:30–36
16. Suarez-Kurtz G, Pena SD (2006) Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets* 7:1649–1658
17. Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Gesteira A, Barros F, Carracedo A, Hutz MH (2009) Molecular diversity at the *CYP2D6* locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics* 10:1457–1466
18. Isaza CA, Henao J, López AM, Cacabelos R (2000) Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer *CYP2D6* gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22:695–705
19. Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD (1999) Comparative evolutionary pharmacogenetics of *CYP2D6* in Ngawbe

- and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics* 9:217–228
20. Mendoza R, Wan YJ, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin KM (2001) CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther* 70:552–560
  21. Luo HR, Gaedigk A, Aloumanis V, Wan YJ (2005) Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur J Clin Pharmacol* 61:797–802
  22. Casner PR (2005) The effect of CYP2D6 polymorphisms on dextromethorphan metabolism in Mexican Americans. *J Clin Pharmacol* 45:1230–1235
  23. López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME (2005) CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol* 61:749–754
  24. LLerena A, Edman G, Cobaleda J, Benítez J, Schalling D, Bertilsson L (1993) Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6. *Acta Psychiatr Scand* 87:23–28
  25. Estevez F, Giusti M, Parrillo S, Oxandabarat J (1997) Dextromethorphan O-demethylation polymorphism in the Uruguayan population. *Eur J Clin Pharmacol* 52:417–418

Pedro Dorado, Esther Machín, Fernando de Andrés, María-Eugenia G. Naranjo, Eva M. Peñas-Lledó, Adrián Llerena\* and CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenomics RIBEF<sup>a</sup>

# Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes

## Abstract

**Background:** Losartan is metabolized to losartan carboxylic acid (E-3174) by the polymorphic cytochrome CYP2C9. The aim of the study was to develop a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with fluorescence detection for simultaneously measuring losartan and its metabolite E-3174 in urine to evaluate the losartan urinary metabolic ratio (MR: losartan/E-3174) for CYP2C9 phenotyping in humans.

**Methods:** The compounds were separated in a reversed-phase chromatographic column and detected by fluorescence at a wavelength of 250 nm for excitation and of 370 nm for emission.

**Results:** No analytical interferences with endogenous compounds were found, and the extraction recoveries were over 88%. Limits of quantification of 2 ng mL<sup>-1</sup> for losartan and 5 ng mL<sup>-1</sup> for E-3174 were achieved, as well as good reproducibility with coefficients of variation of <9% in all cases. Analyses with the present HPLC method show significant differences ( $p < 0.05$ ) in losartan MRs between the four CYP2C9 genotype groups in 13 Spanish healthy volunteers.

**Conclusions:** The method developed is simple and affordable, as well as sensitive and reliable to calculate the MR. Therefore, it appears to be useful for CYP2C9 phenotyping using losartan as a drug test in populations, such as Hispanics with different allele combinations.

**Keywords:** CYP2C9; Hispanics; losartan; pharmacogenetics; phenotype.

Badajoz, Spain, Phone: +34 924218040, Fax: +34 924289675, E-mail: allerena@unex.es

**Pedro Dorado:** CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

**Esther Machín:** CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

**Fernando de Andrés:** CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

**María-Eugenia G. Naranjo:** CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

**Eva M. Peñas-Lledó:** CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

## Introduction

Losartan is a selective angiotensin II receptor antagonist used in the treatment of hypertension and heart failure (1). It undergoes CYP-mediated oxidative metabolism. Its active metabolite, losartan carboxylic acid (E-3174), is metabolized by CYP2C9 and CYP3A4 in vitro (2, 3); however, the role of CYP3A4 is negligible at concentrations of losartan lower than 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  corresponding to therapeutic plasma levels (4). Thus, CYP2C9 plays an important role in the metabolism of losartan and of other therapeutically used drugs, including warfarin, phenytoin, tolbutamide, glipizide, fluoxetine and several non-steroidal anti-inflammatory drugs (5–8). The clinical relevance of the CYP2C9 gene has been the subject of study (9–12) as it is polymorphic (13), with alleles CYP2C9\*2 (Cys144Ile359) and CYP2C9\*3 (Arg144Leu359) coding for lower enzyme activity than the most common CYP2C9\*1 (Arg144Ile359) (9, 14, 15). Low CYP2C9 enzyme hydroxylation capacity seems to be related to the occurrence of adverse drug reactions, for example during phenytoin treatment (16, 17).

Losartan appears useful and safe for the evaluation of CYP2C9 activity in humans (6, 7). However, there is a need

<sup>a</sup>For the members of CEIBA.FP (European Ibero American Consortium for Population Pharmacogenetics)/RIBEF (Ibero Latino American Network of Pharmacogenetics), please refer to the end of this article.

\*Corresponding author: Adrián Llerena, CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, 06080,



for more simple methods for routine analysis to determine losartan and E-3174, for example, with fluorescence detectors (18), than the other analytical methods that have been developed, including capillary electrophoresis (19), liquid chromatography coupled to ultraviolet (UV) (20), and mass spectrometry (21, 22). The development of such an affordable analytical method must focus on simplicity because existing high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods require significant time and work associated with their clean-up and extraction steps. Thus, the aim of the study was to develop a simple, precise, sensitive, and reproducible HPLC method with fluorescence detection for simultaneously measuring losartan and its metabolite E-3174 in urine to evaluate the losartan urinary metabolic ratio (MR: losartan/E-3174) to be used as a phenotyping test of CYP2C9 in human studies.

## Materials and methods

### Chemicals and materials

Losartan and losartan carboxylic acid (E-3174) standards were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (Figure 1). Individual stock standard solutions were prepared in methanol at a concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  and stored in the dark at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Working solutions were prepared fresh by diluting the standard solutions with methanol at concentrations of 1 and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  and stored at  $4^\circ\text{C}$  in the dark. The water, acetonitrile (HPLC grade) and 85% orthophosphoric acid, used to prepare the mobile phase, and HPLC-grade methanol, used for liquid-liquid extraction, were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Methyl tert-butyl ether (MTBE) UV-IR-HPLC preparative grade used for the extraction process, and analytical grade disodium hydrogen phosphate dihydrate used to prepare the mobile phase were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

### Equipment

Chromatographic analysis of the analytes was performed on an LC 118 Beckman-Coulter liquid chromatography system (Beckman-Coulter,

Palo Alto, CA, USA) equipped with a solvent pump (model 118), a Rheodyne injection valve (model 7725i), and a UV detector (module 166). The chromatograph was coupled to a fluorescence detection system from Jasco (model FP-2020, Tokyo, Japan) equipped with a fluorescence flow-cell directly connected to the excitation and emission light guides. The detector was also equipped with a xenon lamp as the irradiation source (power 150 W) with a radiation range lying between 220 and 700 nm, and includes a photomultiplier detection unit also working in the 220–700 nm range. Data were acquired, and the equipment was controlled using the Beckman 32 Karat v7.0 software. The results were obtained using a modified phenyl column of  $250 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$  and  $5 \mu\text{m}$  particle size (ACE Phenyl, Aberdeen, Scotland, UK). Additionally, an analytical guard cartridge ( $10 \times 3 \text{ mm}$  and  $5 \mu\text{m}$  particle size; ACE Phenyl) was situated upstream of the chromatographic column to retain the remaining impurities and to improve the selectivity of the method.

### Sample preparation

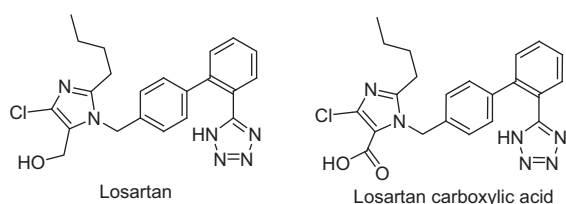
Urine concentrations of losartan and E-3174 were determined in 13 samples of healthy subjects, which had previously been analyzed (6) and then stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further use. An aliquot of 1 mL of human urine was put into a polypropylene tube, and  $200 \mu\text{L}$  of a methanol:water solution (50:50, v/v), together with 5 mL of MTBE was added. The final solution was vortexed vertically for 30 s and then centrifuged at  $1400 g$  for 5 min. The centrifuged sample was frozen, and the organic layer was transferred to a clean polypropylene tube. This tube was evaporated at room temperature to dryness under a stream of nitrogen, and the residue was reconstituted in  $200 \mu\text{L}$  of the mobile phase. Finally,  $50 \mu\text{L}$  of this solution was directly injected into the HPLC system.

### Chromatographic conditions

The mobile phase was a binary mixture of acetonitrile and 20 mM disodium hydrogen phosphate buffer (34:66, v/v), adjusted to pH 2.3 with phosphoric acid, in an isocratic elution mode at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Mobile phases were filtered daily through nylon Millipore filters (Millipore, Bedford, MA, USA) before use. The chromatographic column was maintained at room temperature. The injection volume was  $50 \mu\text{L}$  both for standards and for samples. A monochromator for excitation at a wavelength of 250 nm and a monochromator for emission at 370 nm were employed for detection.

### Subjects

The urinary concentration of losartan and E-3174 was studied in samples from 8 females and 5 males Spanish subjects (age range, 21–53 years; weight range, 45–90 kg) with genotypes *CYP2C9*\*1/\*1 ( $n=7$ ), \*1/\*2 ( $n=2$ ), \*1/\*3 ( $n=2$ ), and \*3/\*3 ( $n=2$ ) previously analysed with a different HPLC method (6). The genotypes had previously been analyzed by determination of the *CYP2C9*\*2 and *CYP2C9*\*3 alleles (7). All subjects were healthy as assessed by medical history and physical examination. Written informed consent was obtained from the volunteers. The study was approved by the Local Ethics Committee at Extremadura University Hospital (Badajoz, Spain), and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.



**Figure 1** Chemical structures of losartan and losartan carboxylic acid (E-3174).

## Statistical analysis

The urinary losartan/E-3174 ratios were log-transformed and compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. *p*-Values <0.05 were regarded as statistically significant. The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) computer program.

## Results

### Optimization of chromatographic conditions for the HPLC-fluorescence detection method

Prior to applying the proposed method, the parameters causing variability of the measurements, in particular, pH and ionic strength of the buffer solution, were optimized. Acetonitrile-disodium hydrogen phosphate buffer (pH 2.3; 20 mM) (34:66, v/v) in an isocratic elution mode at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> was selected due to the good chromatographic performance it provides and its appropriate 17.5 min run time.

### Validation parameters

To analyze the linearity of the fluorescence detector, calibration curves were plotted as peak height vs. concentration of each analyte. Thus, for losartan and E-3174, five different concentrations in the range of 10–800 ng mL<sup>-1</sup> were tested in triplicate, and the correlation coefficient (*R*<sup>2</sup>) was calculated to confirm the linearity of the calibration curves. Analytes after the liquid-liquid extraction step were reconstituted in the proper separation mobile phase and injected into the chromatographic system for their individual separation and quantification. The limit

of detection (LOD) was calculated by measuring the noise in different blanks, taking into account a signal-to-noise ratio of 3, and the limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration in the standard curve with a coefficient of variation (CV) below 15% and a mean fitted value that did not deviate from the nominal value by over 15%. The LOD and LOQ calculations were performed, taking into account the overall process (extraction and chromatography steps). To evaluate the intra-day precision, expressed as CV, six replicate injections of blank urine samples spiked with standard solutions of losartan and E-3174 at concentrations of 50, 100, and 200 ng mL<sup>-1</sup> were performed. The same procedure was repeated on different days for a month and by another technician to determine the inter-day precision.

Table 1 presents the analytical figures of merit, namely, linear range, intercept and slope of the curve, regression coefficient, precision and sensitivity (as LOD and LOQ) for each analyte. The mean (±SD) retention times (min; *n*=10), under the optimum conditions were 11.7±0.3 min for losartan and 16.7±0.4 min for E-3174. Moreover, a high resolution of 2.51 between losartan and E-3174 was obtained, and no endogenous interferences co-eluted with these two analytes when samples were injected into the HPLC system (Figure 2).

To evaluate the applicability of the method, recovery studies were performed with urine samples at different concentration levels of losartan and E-3174 within the linear interval of the method's analytical curves. Table 2 gives the absolute recoveries for the analytes.

### Losartan/E-3174 urinary ratios and CYP2C9 genotypes

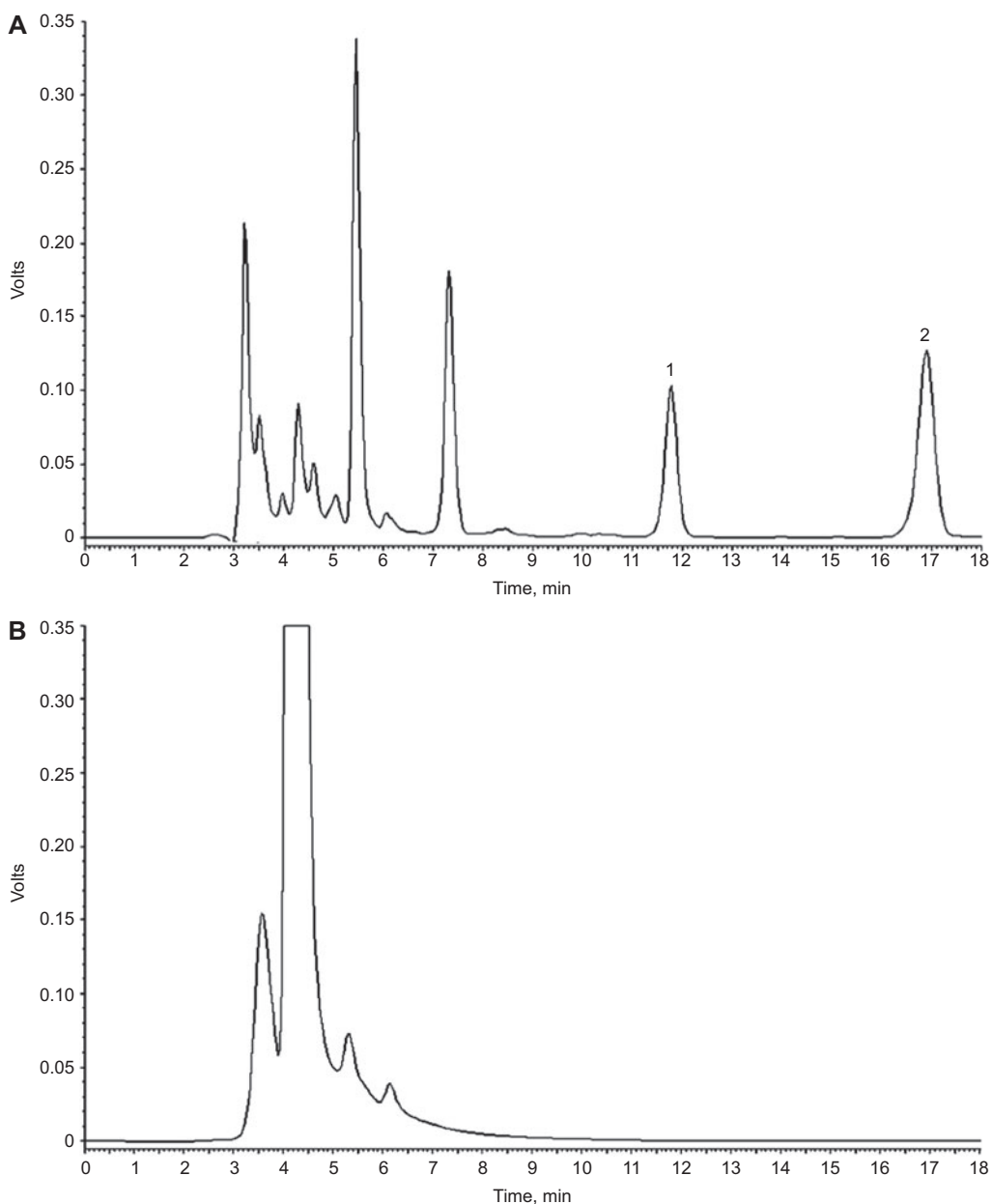
Losartan MRs, as determined by the present method, were similar to those previously determined with a different HPLC method (6) (Figure 3). As also had been found in

	Linear range, ng mL <sup>-1</sup>	$Y=(a\pm S_a)X+(b\pm S_b)$	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>S</i> <sub><i>y/x</i></sub>	LOD	LOQ	Precision	
							Intra-day	Inter-day
Losartan	10–800	$Y=(4.2E^{-5}\pm 1E^{-6})C_L-(2.2E^{-5}\pm 2.6E^{-4})$	0.999	4.6E <sup>-4</sup>	1	2	2.61	5.69
E-3174	10–800	$Y=(2.46E^{-4}\pm 4E^{-6})C_E-(8.5E^{-4}\pm 1.31E^{-3})$	0.999	2.3E <sup>-3</sup>	1	5	2.69	8.81

**Table 1** Validation parameters for the HPLC method to determine losartan and losartan carboxylic acid contents.

*a*, slope (V ng mL<sup>-1</sup> for losartan and E-3174); *S*<sub>*a*</sub>, standard deviation of the slope; *b*, intercept (V for both analytes); *S*<sub>*b*</sub>, standard deviation of the intercept; *R*<sup>2</sup>, regression coefficient; *S*<sub>*y/x*</sub>, standard deviation of residuals; LOD, limit of detection (ng mL<sup>-1</sup>); LOQ, limit of quantification (ng mL<sup>-1</sup>); precision expressed as coefficient of variation (%; *n*=6).





**Figure 2** Fluorescence chromatogram obtained from human urine with losartan and E-3174 (A) and from blank human urine (B). Peaks: 1, losartan; 2, E-3174.

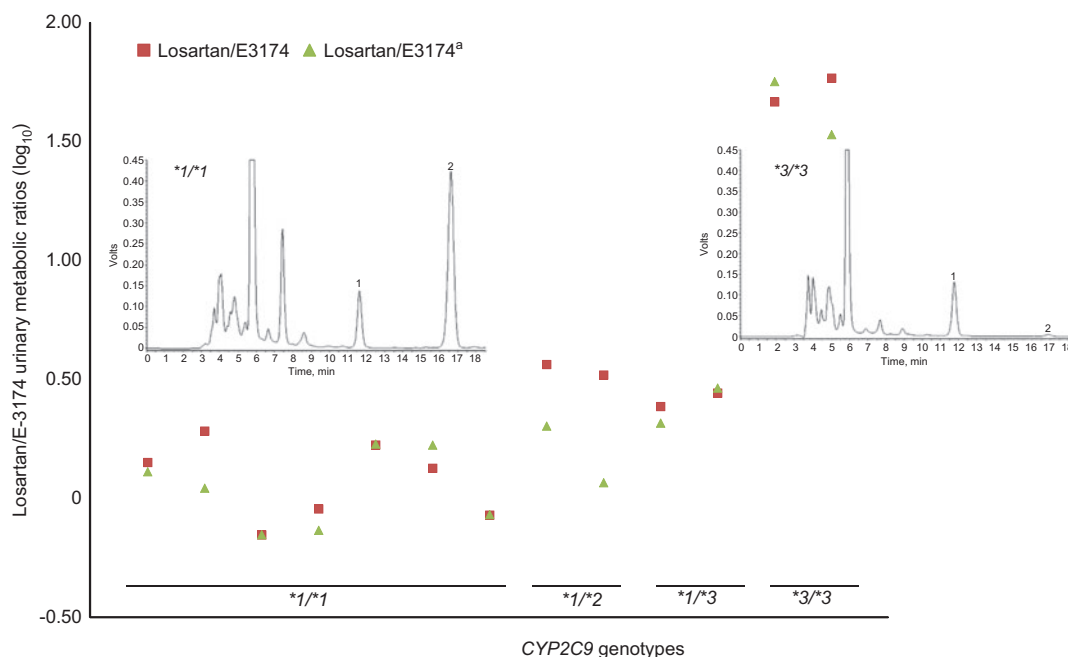
that previous work (6), the present HPLC analyses showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in losartan MRs between the four *CYP2C9* genotype groups (Figure 3).

Concentration, ng mL <sup>-1</sup>	% Recovery, mean ± CV	
	Losartan	E-3174
50	102 ± 13	105 ± 8.5
100	97.6 ± 7.3	102 ± 3
200	99.3 ± 6.4	88.2 ± 11.4

**Table 2** Recovery of the analytical method (n=4).

## Discussion

The methodology proposed here represents a more economic alternative than other methodologies utilizing mass spectrometry detectors (21, 22) due to the use of more affordable instrumentation and solvents. Additionally, the sensitivity of the present HPLC method is a major improvement over that of a previous publication (6), and good levels of precision and accuracy were achieved. The extraction recoveries for losartan and E-3174 ranged from 88.2% to 105%, which are not only consistent with the



**Figure 3** Relationship between losartan/E3174 ( $\text{Log}_{10}$ ) and *CYP2C9* genotypes in 13 healthy volunteers analyzed with the newly developed (squares) and previously (triangles) reported (from Ref. #6) HPLC methods.

The chromatograms were obtained after the analysis of urine samples corresponding to \*1/\*1 and \*3/\*3 genotypes. Peaks: 1, losartan; 2, E-3174.

high recoveries obtained with previously reported liquid-liquid extraction processes (21, 23), but also improve the recoveries obtained with solid-phase extraction procedures (24). Thus, the liquid extraction procedure reported here represents a simple and fast process to eliminate interferences from the matrix and to efficiently extract the analytes. Thus, the method described here presents a potential alternative for *CYP2C9* phenotyping in routine labs.

When the method was used to evaluate the relationship between losartan MR and *CYP2C9*, significant differences across genotypes were found, which is in agreement with previous data (6) (Figure 3). Indeed, there were no differences found between the losartan MRs determined by this new method and by the previous method. Both sets of results showed that *CYP2C9* genotypes are related to the losartan metabolic ratios.

Considering that the HPLC method developed appears to strongly discriminate losartan MR differences between *CYP2C9* genotypes, it could be used to study pheno-genotype relationships in admixed populations. Although genotyping is of use, phenotyping is needed due to the lack of correlations between pheno and genotypes, specifically in admixed populations. For example, we have shown the lack of any relationship between *CYP2D6* phenotypes and genotypes in Hispanics from Nicaragua and Cuba, because only 23.5% of individuals carrying *CYP2D6* gene

multiplications were phenotypically ultrarapid metabolizers (UMs), whereas only 40% of those phenotypically UMs showed multiplications (25). Therefore, it appears necessary to further study the *CYP2C9* pheno-genotype relationship in populations with large genetic variability, such as Ecuadorians (26) and Mexicans (27, 28). For this purpose, the present method will be used in the Hispanic populations included in the CEIBA consortium within the Ibero-Latino-American Pharmacogenomics Network, RIBEF.

**Acknowledgments:** This study was partially supported by the Institute of Health Carlos III-FIS and the European Union (FEDER) Grants PI10/02010, PI10/02758, and CP06/00030 (PD); Gobierno de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e Innovación and the European Union (Fondo Social Europeo) Grant PD10199 (MEGN); and Consejería de Sanidad y Dependencia PRIS10043; and Gobierno de Extremadura AEXCID Cooperación Extremeña (11IA002) to the SIFF-RIBEF network (Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica; www.ribef.com).

The following members listed by country in alphabetical order (\*Group Coordinator), constitute the “CEIBA. FP (Consorcio Europeo Ibero-Americano de Farmacogenética de Poblaciones)/RIBEF (Red Iberoamericana de Farmacogenética)”; “CEIBA.FP (European Ibero American

Consortium for Population Pharmacogenetics)/RIBEF (Ibero Latino American Network of Pharmacogenetics)”:

Group 01: Authors: Graciela E. Moya\*, Verónica Ferreira. Institutions: UCA Pontificia Universidad Católica Argentina and Fundación GENOS, Buenos Aires, Argentina.

Group 02: Author: Eduardo Tarazona-Santos\*. Institution: UFMG Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Group 03: Authors: Jenny Fiedler\* (1), Luisa Herrera (1), Romina Rojas-Ponce (2). Institutions: UCH Universidad de Chile, Santiago (1) and UCON Universidad de Concepción, Concepción, Chile (2).

Group 04: Authors: Alba P. Sarmiento\*, Angélica Borbón. Institution: PUJ Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Group 05: Authors: Ramiro Barrantes\*, Gerardo Jiménez-Arce, Carolina Céspedes. Institution: UCR Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Group 06: Authors: Idania Rodeiro\* (1), Mayra Álvarez (2), Bárbaro Pérez (2), Luis R. Calzadilla (3), René Delgado (4), Diadelis Remírez (5). Institutions: CEBIMAR (1); Facultad de Medicina Calixto García (2); Centro Comunitario de Salud Mental La Habana Vieja (3); Centro para las Investigaciones y Desarrollo de los Medicamentos, CIDEM (4); Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, CEMED (5), La Habana, Cuba.

Group 07: Authors: Enrique Terán\* (1,2), Natalia Heras (2), Leonardo J. Beltrán (2), Francisco Hernández (3). Institutions: USFQ Universidad San Francisco de Quito (1), UCE Universidad Central de Ecuador, Quito (2) and UG Universidad Estatal de Guayaquil (3), Ecuador.

Group 08: Authors: Rocío Ortiz-López\*, Augusto Rojas-Martínez, Lourdes Garza-Ocañas, Yadira X. Pérez-Páramo. Institution: UANL Universidad

Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Group 09: Authors: Marisol López-López\* (1), Alberto Ortega-Vázquez (1), Elisa Alonso-Vilatela (2), Nancy Monroy-Jaramillo (2), Teresa Corona Vázquez (2), Petra Yescas-Gómez (2), Adriana Ochoa-Morales (2). Institutions: UAM Universidad Autónoma Metropolitana (1) and Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (2), México DF, México.

Group 10: Authors: Martha G. Sosa-Macías\*, Carlos Galaviz-Hernández, Ismael Lares-Aseff; Blanca Lazalde. Institution: IPN Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR, Durango, México

Group 11: Author: Ronald Ramirez-Roa\*. Institution: UNAN Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.

Group 12: Authors: Manuela Grazina\*. Institution: UC.PT University of Coimbra, Portugal.

Group 13: Authors: Adrián Llerena\*, Pedro Dorado, Eva M. Peñas-Lledó, Jesús Cobaleda, M. Eugenia G. Naranjo, Fernando de Andrés. Institutions: UEX University of Extremadura, Badajoz, Spain.

Group 14: Authors: Francisco E. Estévez-Carrizo\*, Nicolás González-Vacarezza. Institution: UM Universidad de Montevideo, Uruguay.

## Conflict of interest statement

**Authors' conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

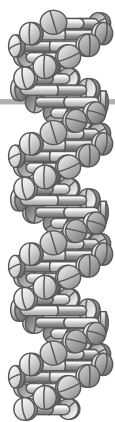
**Honorarium:** None declared.

Received May 10, 2012; accepted June 25, 2012

## References

1. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993;45:205–51.
2. Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* 1995;23:207–15.
3. Yun CH, Lee HS, Lee H, Rho JK, Jeong HG, Guengerich FP. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (DuP 753) in human liver microsomes: role of cytochrome P4503A(4) in formation of the active metabolite EXP3174. *Drug Metab Dispos* 1995;23:285–9.
4. Yasar Ü, Tybring G, Hidestrand M, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Dahl ML, et al. The role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1051–6.
5. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:525–38.
6. Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjöqvist F, et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite

- E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:89–98.
7. Dorado P, Berecz R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, Llerena A. CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:221–5.
  8. Llerena A, Dorado P, Berecz R, González AP, Peñas-Lledó EM. Effect of CYP2D6 and CYP2C9 genotypes on fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during steady-state conditions. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;59:869–73.
  9. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;6:341–9.
  10. van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* 2001;11:287–91.
  11. Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, Uwai Y, Hattori H, Furusho K, et al. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:287–92.
  12. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717–9.
  13. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Available at: [www.CYPalleles.ki.se](http://www.CYPalleles.ki.se). Accessed March 19, 2012.
  14. Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily [published erratum appears in *Biochemistry* 1993;32:1390]. *Biochemistry* 1991;30:3247–55.
  15. Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 1994;4:39–42.
  16. Rettie AE, Haining RL, Bajpai M, Levy RH. A common genetic basis for idiosyncratic toxicity of warfarin and phenytoin. *Epilepsy Res* 1999;35:253–5.
  17. Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro N. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. *Ther Drug Monit* 2000;22:230–2.
  18. del Rosario Brunetto M, Contreras Y, Clavijo S, Torres D, Delgado Y, Ovalles F, et al. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50:194–99.
  19. Zhang M, Wei F, Zhang YF, Nie J, Feng YQ. Novel polymer monolith microextraction using a polymethacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J Chrom A* 2006;1102:294–301.
  20. Yeung PKF, Jamieson, A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *Int J Pharm* 2000;204:17–22.
  21. Polinko M, Riffel K, Song H, Lo MW. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2003;33:73–84.
  22. Shah HJ, Kundlik ML, Patel NK, Subbaiah G, Patel DM, Suhagia BN, et al. Rapid determination of losartan and losartan acid in human plasma by multiplexed LC-MS/MS. *J Sep Sci* 2009;32:3388–94.
  23. Ritter MA, Furtek CI, Lo M-W. An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 1997;15:1021–9.
  24. Iwasa T, Takano T, Hara K, Kamei T. Method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP-3174, in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;734:325–30.
  25. Llerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Alvarez M, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Calzadilla LR. CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J* 2012;12:176–183.
  26. Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Teran E, Llerena A. CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68:637–44.
  27. Sosa-Macías M, Dorado P, Alanis-Bañuelos RE, Llerena A, Lares-Asseff I. Influence of CYP2D6 deletion, multiplication, -1584C→G, 31G→A and 2988G→A gene polymorphisms on dextromethorphan metabolism among Mexican tepehuanos and mestizos. *Pharmacology* 2010;86:30–6.
  28. Dorado P, Sosa-Macías MG, Peñas-Lledó EM, Alanis-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, et al. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2011;11:108–12.



# Losartan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population: influence of *CYP2C9* genetic polymorphism, habits and gender

**Aim:** To describe for the first time *CYP2C9* hydroxylation phenotype with *CYP2C9* genotypes in a Hispanic (Ecuadorian) population using losartan; and the relevance of gender, tobacco, ethanol and caffeine consumption on the enzyme hydroxylation capacity. **Methods:** Ecuadorian healthy volunteers ( $n = 194$ ) received a single oral dose of 25 mg losartan. Losartan metabolic ratio was defined as losartan:E3174 concentration. *CYP2C9* alleles \*2, \*3, \*4, \*5 and \*6 were analyzed. **Results:** No phenotypically poor metabolizers were found. The metabolic ratio (mean  $\pm$  standard deviation) was higher ( $p < 0.05$ ) in *CYP2C9*\*1/\*3 carriers ( $12.4 \pm 13.8$ ;  $n = 6$ ) versus *CYP2C9*\*1/\*1 ( $4.9 \pm 7.0$ ;  $n = 167$ ), as well as in females versus males ( $6.72 \pm 9.72$  and  $3.76 \pm 4.48$ , respectively;  $p < 0.05$ ). Only the following genotypes, *CYP2C9*\*1/\*1, *CYP2C9*\*1/\*2 and *CYP2C9*\*1/\*3, were found with a frequency of 86.1%, 10.8% and 3.1%, respectively. **Conclusion:** Despite the mean metabolic ratio being higher in this population than in others previously studied across genotypes, no poor metabolizers, either phenotypically or genotypically, were found.

Original submitted 21 August 2012; Revision submitted 21 September 2012

**KEYWORDS:** *CYP2C9* genotype • *CYP2C9* hydroxylation • Ecuadorians • Hispanics • losartan

*CYP2C9* plays an important role in the metabolism of clinically relevant drugs, including warfarin, phenytoin, tolbutamide, glipizide, fluoxetine, several nonsteroidal anti-inflammatory drugs and losartan [1–4]. *CYP2C9* is subject to genetic polymorphism. Some *CYP2C9* variants code for proteins with decreased or null activity [101].

The metabolism of losartan, a selective angiotensin II receptor antagonist [5], undergoes CYP-mediated oxidative metabolism. Its active metabolite, losartan carboxylic acid (E3174), is formed by *CYP2C9* and *CYP3A4* *in vitro* [6,7]; however, the role of *CYP3A4* is negligible [8]. Thus, some studies have suggested that the losartan:E3174 ratio may be used as a safe and reliable phenotypic probe for measuring *CYP2C9* activity *in vivo* [2,9]. Although, other drugs such as tolbutamide, warfarin, flurbiprofen, phenytoin or diclofenac have been shown as probes for *CYP2C9* activity *in vivo* [3,9–11], losartan appears to be safer [2].

Besides genotype, other factors such as gender, tobacco, caffeine or ethanol consumption have also been reported to influence the variability in drug metabolism [12–14]. Ethanol has been shown to inhibit *CYP2C9* activity *in vitro* [15]. Also *in vitro*, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol has been recently related to the inhibition of *CYP2C9* expression [16], which could support

gender-related differences in *CYP2C9* activity. However no data about the influence of gender and habits on *CYP2C9* activity *in vivo* exist.

Interethnic differences in CYP-metabolizing enzymes, due to both genetic and environmental factors might be partially responsible for the variability of adverse drug reactions or therapeutic failure between populations [17]. In keeping with that, incident heart failure, which appears to be more common among black than nonblack hypertensive patients [18], could be related to the involvement of polymorphic CYPs in the metabolism of some antihypertensive drugs [1]. Since some *CYP2C9* substrate-induced adverse drug reactions can be very severe (e.g., warfarin-induced bleeding complications [19,20]), the study of the *CYP2C9* ethnic variability could be of clinical benefit. Therefore, the study of *CYP2C9* phenotype and genotype in a 'mestizo' (mixture between Andean and Hispanic people) population of Ecuador could be important considering the lack of information in this ethnic group, which is part of the very large group of Hispanics.

The study aimed to describe *CYP2C9* hydroxylation phenotypes in an Ecuadorian population using losartan as a probe drug in order to determine whether differences with previously studied populations existed, and to analyze whether *CYP2C9* genotypes, gender,

Pedro Dorado<sup>1</sup>,  
Leonardo J Beltrán<sup>2</sup>,  
Esther Machín<sup>1</sup>,  
Eva M Peñas-Lledó<sup>1</sup>,  
Enrique Terán<sup>2,3</sup>,  
Adrián Llerena<sup>\*†1</sup>  
& the CEIBA.FP  
Consortium of the Ibero-  
American Network of  
Pharmacogenetics and  
Pharmacogenomics  
RIBEF

<sup>1</sup>CICAB Centro de Investigación Clínica, University of Extremadura, SES Servicio Extremeño de Salud, Hospital Universitario Infanta Cristina, 06080 Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Biomedical Centre, Central University of Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>3</sup>Health Science College, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

\*Author for correspondence:

Tel.: +34 924 218 040

Fax: +34 924 219 881

allerena@unex.es

<sup>†</sup>Authors contributed equally

Future  
Medicine  part of 



tobacco, ethanol and caffeine consumption influenced the losartan:E3174 metabolic ratio.

## Methods

### ■ Subjects & study protocol

One hundred and ninety four unrelated healthy individuals (112 females and 82 males) with a mean ( $\pm$ standard deviation [SD]) age of 21.5 ( $\pm$ 3.7) years old. They were mostly students at the Central University of Ecuador (Quito, Ecuador), from different regions in Ecuador. All participants were defined as mestizo. All were healthy as assessed by a routine clinical examination (that included body temperature, pulse rate, blood pressure, height and weight) and a medical history was taken before the study. Volunteers with a previous history of adverse drug effects and those with any drug or medicinal herbal intake in the 2 weeks before the study were excluded from participation in the study. Women who reported or suspected pregnancy were also excluded from the study. Information on tobacco, caffeine or ethanol consumption was obtained by direct interview [14]. In the studied population, 23% were occasional consumers of alcoholic beverages ( $\geq$ 100 g ethanol/week), 34% were consumers of more than one cup of beverage with caffeine ( $\geq$ 120 mg caffeine/day), and 0% were heavy smokers ( $\geq$ 10 cigarettes/day), however 17% of them smoked 1–5 cigarettes/day.

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent, and the research was approved by the Bioethics Committee of the Central University of Ecuador.

### ■ Phenotyping procedure

To determine losartan:E3174 urinary metabolic ratio the subjects were given a single oral dose of 25 mg losartan (Cozaar<sup>®</sup>, Merck Sharp & Dohme, Whitehouse Station, NJ, USA). To minimize the effect of food on the pharmacokinetics of the drug absorption, losartan was given in the evening before going to bed, at least 2 h after the last meal. All urine was collected over 8 h. After the measurement of urine volume, two samples of 20 ml each were stored at -20°C until analysis.

Concentrations of losartan and its carboxylic acid metabolite (E3174) were analyzed in urine samples using specific HPLC with fluorescence detection [21]. Briefly, the liquid–liquid extraction procedure was optimized for sample clean-up and analyte isolation. The compounds were separated in a reversed phase chromatographic

column. The mobile phase was a binary mixture of acetonitrile and 20 mM disodium hydrogen phosphate buffer (34:66 v/v) adjusted to pH 2.3 with phosphoric acid in an isocratic elution mode at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. A monochromator for excitation at a wavelength of 250 nm and a monochromator for emission at 370 nm were employed for detection. No analytical interferences with endogenous compounds were found. In order to evaluate the applicability of the method, recovery studies were carried out with urine samples at different concentration levels of losartan and E3174 within the linear interval of the method's analytical curves and the obtained extraction recoveries were over 88% (minimum recovery mean  $\pm$  SD: 97.6  $\pm$  7.3% and 88.2  $\pm$  11.4% to losartan and E3174, respectively) [21]. Limits of quantitation of 2 ng ml<sup>-1</sup> for losartan and 5 ng ml<sup>-1</sup> for E3174 were achieved as well as reproducibility with coefficients of variation of less than 9% in all cases.

### ■ CYP2C9 genotyping

Venous blood (10 ml) was obtained from each volunteer and collected in ethylenediaminetetraacetic acid tubes. Genomic DNA was isolated using the Genra Puregen<sup>®</sup> kit (Qiagen, Indianapolis, IN, USA). Genotyping for *CYP2C9*\*2, \*3, and \*6 allelic variants was performed using fluorescence-based, allele-specific TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping for *CYP2C9*\*4 and \*5 alleles was performed using PCR with the conditions, primers and restriction enzymes described elsewhere [22,23]. For each *CYP2C9* SNP for *CYP2C9*\*2, \*3 and \*6 allele identification, a predeveloped TaqMan assay reagent kit, containing one pair of PCR primers and one pair of fluorescent TaqMan probes was purchased from Applied Biosystems. PCR amplification for all SNPs was performed in 20  $\mu$ l reactions with 30 ng template DNA, TaqMan Universal Master Mix 1X (Applied Biosystems), each primer and probe assay 1X and water. Thermal cycling was initiated with a first denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s, and annealing at 60°C for 1 min. The allele detection process was performed for 1 min at 60°C on a Fast 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) to determine the allelic discrimination.

### ■ Statistics

The urinary losartan:E3174 ratios were compared across the *CYP2C9* genotype groups by

one-way analysis of variance test. A *post hoc* Fisher's least significant difference was used to assess statistical differences between groups. Student's *t*-test was used to evaluate the influence of gender, tobacco smoking, caffeine or alcohol intake habits on the urinary losartan:E3174 ratio in this population. The Hardy–Weinberg equilibrium was determined by comparing the genotype frequencies with the expected values using a contingency table  $\chi^2$  statistic with Yates's correction. Fisher's exact tests were used to compare differences in *CYP2C9* allele frequencies. *p*-values less than 0.05 were regarded as statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

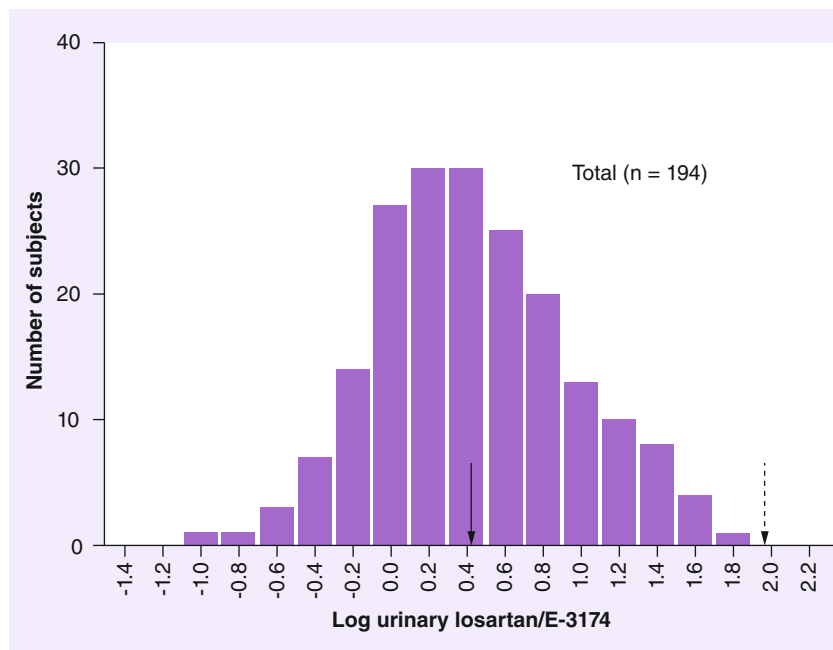
### ■ CYP2C9 hydroxylation phenotype

The losartan:E3174 ratio ranged from 0.08 to 52.7 across individuals, and showed a unimodal distribution (FIGURE 1). The mean metabolic ratio was higher in this population than in other previously studied across all genotypes (TABLE 1). However, no subject could be classified as a poor metabolizer either phenotypically or genotypically. Consistently, there was an absence of individuals *CYP2C9*\*2/\*2, \*3/\*3 and \*2/\*3. The *CYP2C9* genotype frequencies corresponded to those predicted by the Hardy–Weinberg equation ( $\chi^2$  test;  $p > 0.05$ ) (TABLE 2). Frequencies for the *CYP2C9*\*1, \*2 and \*3 alleles were 0.930 (95% CI: 0.905–0.956), 0.054 (95% CI: 0.032–0.077) and 0.015 (95% CI: 0.003–0.028), respectively. No subject with \*4, \*5 and \*6 alleles was detected in this population.

### ■ Relevance of CYP2C9 genotype, gender & habits

The urinary losartan:E3174 ratio (mean  $\pm$  SD) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in subjects with *CYP2C9*\*1/\*3 genotype ( $12.4 \pm 13.8$ ;  $n = 6$ ) than in subjects with *CYP2C9*\*1/\*1 genotype ( $4.9 \pm 7.0$ ;  $n = 167$ ). Moreover, losartan:E3174 ratio in the *CYP2C9*\*1/\*2 group ( $7.8 \pm 12.4$ ;  $n = 21$ ) was also higher than in those with *CYP2C9*\*1/\*1 genotypes; however, this difference did not reach statistical significance.

No difference was found in losartan:E3174 ratio between consumers and nonconsumers of tobacco smoking, caffeine or alcohol intake. However overall, losartan:E3174 (mean  $\pm$  SD) was higher in females than in males ( $6.72 \pm 9.72$  vs  $3.76 \pm 4.48$ ;  $p < 0.05$ ) regardless of the genotype, and also in females ( $n = 94$ )



**Figure 1. Histogram of losartan/losartan carboxylic acid metabolite log ratios among 194 healthy Ecuadorian subjects.** The continuous arrow shows the mean losartan:E3174 log ratio in the overall population. The discontinuous arrow shows the 'hypothetical' cutoff value for poor metabolizers based on the mean of losartan:E3174 log ratio of the *CYP2C9*\*3/\*3 subjects calculated from [2,24,25].

versus males ( $n = 73$ ) *CYP2C9*\*1/\*1 carriers ( $5.92 \pm 8.40$  vs  $3.63 \pm 4.22$ ;  $p < 0.05$ ).

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study in a Hispanic population reporting the *CYP2C9* hydroxylation phenotypes and genotypes, and to date, the largest phenotyping study using losartan as a probe drug for *CYP2C9* [2,24,25]. The median or mean urinary losartan:E3174 ratios were higher than in previously published population studies from Turkey [24] and Sweden [25] across the genotype groups (TABLE 1). However, these differences cannot be related to the presence of poor metabolizers, since none of them were found either phenotypically or genotypically. The genotypic influence is still not totally explained, probably due to the large variation within subjects genotyped as *CYP2C9*\*1/\*1. The complete genetic explanation for this variability remains unclear but it will need clarification. Therefore, these differences may be due to the presence of environmental factors, types of foods or supplements and/or unknown *CYP2C9* allele variants potentially related to decreased enzyme activity. These reasons are likely since the present population has a component of Andean ancestry, which has not been previously described.

Table 1. Comparison of CYP2C9 genotypes and losartan/losartan carboxylic acid urinary (0–8 h) ratios across different populations.

CYP2C9 genotype	Swedish [25]			Ecuadorians (present study)			Turkish [24]†			Ecuadorians (present study)		
	n	Mean	± SD	n	Mean	± SD	n	Median	Range	n	Median	Range
CYP2C9*1/*1	81	0.9**	1.7	167	4.9	7.0	58	0.7	0.23–28.60	167	2.5	0.103–39.80
CYP2C9*1/*2	19	1.2*	1.8	21	7.9	12.4	10	0.9	0.30–1.63	21	2.3	0.08–52.67
CYP2C9*1/*3	20	2.3	2.1	6	12.4	13.8	12	2.4	0.75–6.26	6	5.2	1.93–35.27
CYP2C9*2/*2	2	0.5; 3.4*	–	0	–	–	3	1.5	1.40–3.81	0	–	–
CYP2C9*2/*3	2	2.6; 3.4*	–	0	–	–	1	3.9	–	0	–	–
CYP2C9*3/*3	2	20; 200*	–	0	–	–	1	160.7	–	0	–	–

†The results of this study presented the median (range). The medians of the CYP2C9 genotype groups in this Ecuadorian population were 2.1–3.5-fold higher than those in the Turkish population.

\*Only two cases were present; therefore, the original values are given instead of the mean.

\*p < 0.05 comparisons (Student's t-test) with the \*1/\*2 group of the present study; \*\*p < 0.0001 comparisons (Student's t-test) with the \*1/\*1 group of the present study.

SD: Standard deviation.

The differences in metabolic ratios across CYP2C9 genotype groups are consistent with previous findings that demonstrated lower losartan:E3174 ratios in subjects homozygous for the CYP2C9\*1 allele than in those carrying either CYP2C9\*3 or CYP2C9\*2 alleles [2,24,25].

In addition, while tobacco smoking, caffeine or alcohol intake habits did not influence the urinary losartan:E3174 ratio, gender did. These differences about higher metabolic ratios in women were not found in the previous studies [24,25]. However, there is evidence supporting the potential relationship between gender and CYP2C9 hydroxylation capacity. For example, women taking oral contraceptives appear to present slower oxidation of losartan than those women who do not take it [25]. Moreover, both ethinylestradiol and medroxyprogesterone have been shown to inhibit CYP2C9-dependent drug metabolism in human liver microsomes *in vitro* [26]. In addition, there have been reports of an association between the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) with CYP2C9 promoter *in vitro*, as

well as the influence of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (an ER $\alpha$  ligand) on the inhibition of CYP2C9 expression [16]. Quantitative PCR analysis revealed that CYP2C9 mRNA levels were significantly suppressed by 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -estradiol [16]. This study demonstrated that ER $\alpha$ , after being activated by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, was able to modulate CYP2C9 promoter activity via a newly detected ER $\alpha$  binding half-site at position -149/-145 [16].

A limitation of the present study is the lack of information about the females' consumption of oral contraceptives, which may partially influence the findings. However in light of existing knowledge, the relevance of gender on CYP2C9 warrants further study. In addition, in light of the present findings future studies in Ecuadorian populations should include the analysis of allelic variants that have been shown to be related to reduced CYP2C9 activity (such as CYP2C9\*8). Furthermore, a correlation analysis between plasma and urine samples should be performed in order to clarify the lower

Table 2. CYP2C9 genotypes in a population of Ecuadorian healthy volunteers (n = 194).

Genotype	Observed			Expected		
	n	%	95% CI	n	%	95% CI
CYP2C9*1/*1	167	86.1	81.2–91.0	168	86.6	81.8–91.4
CYP2C9*1/*2	21	10.8	6.5–15.2	20	10.3	6.0–14.6
CYP2C9*1/*3	6	3.1	0.7–3.5	5	2.6	0.3–4.8
CYP2C9*2/*2	0	–	–	1	0.5	0.0–1.5
CYP2C9*2/*3	0	–	–	0	0.0	0.0–0.0
CYP2C9*3/*3	0	–	–	0	0.0	0.0–0.4



CYP2C9 activity in the Ecuadorian population compared with other ethnic populations (Swedish and Turkish) previously studied.

The frequency of *CYP2C9\*2* (0.05) was found to be similar to those found in Mexican–Americans and Mexican–Mestizos (0.08 and 0.07, respectively) [27,28], Brazilian–Black and intermediates (0.04 and 0.07, respectively) [29] and Bolivians (0.05) [30]; yet it was lower ( $p < 0.05$ ) than the one reported in Spaniards (0.16) [3,28]. Thus, present data are in agreement with our hypothesis about a lower presence of *CYP2C9\*2* allele among Latin Americans due to the oriental ancestry present in native-Americans [27,28].

### Conclusion

In summary, this is the first study in a Hispanic population reporting the CYP2C9 phenotypes and genotypes. This study shows a lower CYP2C9 hydroxylation capacity among Ecuadorians than in other populations, and confirms the influence of the *CYP2C9\*3* allele on the variability of CYP2C9 drug metabolism *in vivo*. The potential influence of gender on CYP2C9 hydroxylation phenotype is also suggested. Additionally, a lower frequency of *CYP2C9\*2* than in Spaniards, and a similar one to that of Mexican–Mestizos, was found. These data are in agreement with previous data corroborating the role of ethnicity for CYP enzyme hydroxylation capacity. Therefore, independent clinical trials considering pharmacogenetic information in Hispanic populations are needed to optimize recommended drug dosages.

### Future perspective

Pharmacogenetics will allow drug individualization and also the development of population-based drug recommendations according to ethnic and cultural factors. Although population pharmacogenetics could be of use in terms of public healthcare, it would be more adequate

to consider the individual than an ethnic-based approach for the treatment of a given subject. In terms of public healthcare, drug policy based on population pharmacogenetics might be useful, allowing the prevention of side effects or therapeutic failures by adjusting the recommended drug dosages to each ethnic group. Information about the differences in the frequencies of relevant pharmacogenetic polymorphisms in ethnic groups of Latin America is needed.

### Acknowledgements

*The study was coordinated in the Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (RIBEF) network Consortium CEIBA for the Study of Pharmacogenetics of Iberoamerican Populations (list of members appears on page 1717). The technical assistance of I López-Ferrer and B Grillo is gratefully acknowledged.*

### Financial & competing interests disclosure

*The study has been partly supported by the Institute of Health Carlos III-FIS and the European Union (FEDER) CIBERSAM and Grants PI10/02010, PI10/02758, and CP06/00030 (PD) and from Gobierno de Extremadura, and FEDER Grants PRIS11051 and BSI0023. The study was partly supported by AEXCID Cooperación Extremeña of Junta de Extremadura (11IA002) to SIFF Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

### Ethical conduct of research

*The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.*

### Executive summary

- This is the first study of CYP2C9 phenotypes and genotypes in an Ecuadorian population.
- The mean losartan:losartan carboxylic acid (E3174) ratio was higher (indicative of lower CYP2C9 hydroxylation capacity) in this population than in others previously studied across all genotypes.
- Overall losartan:E3174 ratio (mean  $\pm$  standard deviation) was higher in females than in males.
- No differences were found in losartan:E3174 ratio with regard to tobacco smoking, caffeine or alcohol intake.
- The urinary losartan:E3174 ratio was significantly higher in *CYP2C9\*1/\*3* genotype carriers than in *CYP2C9\*1/\*1*.
- The frequency of *CYP2C9\*2* was found to be similar to those described in Mexican–Americans and Mexican–Mestizos, Brazilian–Black and Brazilian–intermediates and Bolivians, and it was lower than the reported level in Spaniards. Present data are in agreement with the hypothesis about a lower presence of *CYP2C9\*2* allele among Latin Americans due to the oriental ancestry of native Americans.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- 1 Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45, 525–538 (1998).
- **A review about the structure, drug substrates and factors affecting CYP2C9 activity.**
- 2 Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G *et al.* Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E3174 in relation to the *CYP2C9* genotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* 71, 89–98 (2002).
- **This study evaluated the pharmacokinetics of losartan for the first time in all known *CYP2C9* genotypes.**
- 3 Dorado P, Berecz R, Norberto MJ, Yasar U, Dahl ML, LLerena A. *CYP2C9* genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59, 221–225 (2003).
- 4 LLerena A, Dorado P, Berecz R, González AP, Peñas-LLedó EM. Effect of *CYP2D6* and *CYP2C9* genotypes on fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during steady-state conditions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59, 869–873 (2004).
- 5 Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT *et al.* Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45, 205–251 (1993).
- 6 Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu SH. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab. Dispos.* 23, 207–215 (1995).
- 7 Yun CH, Lee HS, Lee H, Rho JK, Jeong HG, Guengerich FP. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (DuP 753) in human liver microsomes: role of cytochrome P4503A(4) in formation of the active metabolite EXP3174. *Drug Metab. Dispos.* 23, 285–289 (1995).
- 8 Yasar Ü, Tybring G, Hiderstrand M *et al.* The role of *CYP2C9* polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1051–1056 (2001).
- 9 Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of *CYP2C9* activity in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 43, 84–91 (2003).
- 10 Caraco Y, Muszkat M, Wood AJ. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of *CYP2C9* activity *in vivo*. *Pharmacogenetics* 11, 587–596 (2001).
- 11 Kim JS, Nafziger AN, Gaedigk A, Dickmann LJ, Rettie AE, Bertino JS Jr. Effects of oral vitamin K on S- and R-warfarin pharmacokinetics and pharmacodynamics: enhanced safety of warfarin as a *CYP2C9* probe. *J. Clin. Pharmacol.* 41, 715–722 (2001).
- 12 Vesell ES. Genetic and environmental factors affecting drug disposition in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 22, 659–679 (1977).
- 13 Wilson K. Sex-related differences in drug disposition in man. *Clin. Pharmacokinet.* 9, 189–202 (1984).
- 14 LLerena A, Cobaleda J, Martínez C, Benítez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 129–138 (1996).
- **Describes the influence of genetics, smoking and menstrual cycles on the interindividual and interethnic variability in *CYP2D6* activity.**
- 15 Tatsumi A, Ikegami Y, Morii R, Sugiyama M, Kadobayashi M, Iwakawa S. Effect of ethanol on S-warfarin and diclofenac metabolism by recombinant human *CYP2C9.1*. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 517–519 (2009).
- 16 Mwinyi J, Cavaco I, Yurdakok B, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. The ligands of estrogen receptor  $\alpha$  regulate cytochrome P4502C9 (*CYP2C9*) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 302–309 (2011).
- **First study that reveals the mechanism by which estradiol derivatives are able to modify *CYP2C9* activity.**
- 17 LLerena A, Dorado P, Peñas-LLedó EM. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for *CYP2D6* hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics* 10, 17–28 (2009).
- 18 Okin PM, Kjeldsen SE, Dahlöf B, Devereux RB. Racial differences in incident heart failure during antihypertensive therapy. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 4, 157–164 (2011).
- 19 Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human *CYP2C* subfamily. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52, 349–355 (2001).
- 20 Schwarz UI. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human *CYP2C9* gene. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 23–30 (2003).
- 21 Dorado P, Machín E, de Andrés F, González-Naranjo ME, Peñas-LLedó EM, LLerena A. Development of a new HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio and its relation to *CYP2C9* genotypes. *Drug Metab. Drug Interact.* (2012) (In Press).
- 22 Imai J, Ieiri I, Mamiya K *et al.* Polymorphism of the cytochrome P450 (*CYP*) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics* 10, 85–89 (2000).
- 23 Yasar U, Aklillu E, Canaparo R *et al.* Analysis of *CYP2C9\*5* in Caucasian, Oriental and black-African populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58, 555–558 (2002).
- 24 Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M *et al.* *CYP2C9* genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60, 337–342 (2004).
- 25 Sandberg M, Johansson I, Christensen M, Rane A, Eliasson E. The impact of *CYP2C9* genetics and oral contraceptives on cytochrome P450 2C9 phenotype. *Drug Metab. Dispos.* 32, 484–489 (2004).
- **Shows that the use of both oral contraceptives and *CYP2C9* genotype are factors that have an impact on *CYP2C9* phenotype.**
- 26 Laine K, Yasar U, Widén J, Tybring G. A screening study on the liability of eight different female sex steroids to inhibit *CYP2C9*, *2C19* and *3A4* activities in human liver microsomes. *Pharmacol. Toxicol.* 93, 77–81 (2003).
- 27 LLerena A, Dorado P, O’Kirwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML. Lower frequency of *CYP2C9\*2* in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics J.* 4, 403–406 (2004).
- 28 Dorado P, Sosa-Macias MG, Peñas-LLedó EM *et al.* *CYP2C9* allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J.* 11, 108–112 (2011).
- 29 Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. *CYP2C9* genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76, 18–26 (2004).
- 30 Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R. Genetic polymorphism of *CYP2C9* and *CYP2C19* in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 61, 179–184 (2005).

#### Website

- 101 The Human Cytochrome P450 (*CYP*) Allele Nomenclature Committee.  
[www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm)  
 (Accessed 19 August 2012)

#### CEIBA.FP/RIBEF members (\*Group coordinator)

- **Group 1**  
 Authors: Graciela E Moya\*, Verónica Ferreiro  
 Institutions: UCA Pontificia Universidad Católica Argentina & Fundación GENOS, Buenos Aires, Argentina

- **Group 2**  
Author: Eduardo Tarazona-Santos\*  
Institution: UFMG Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
- **Group 3**  
Authors: Jenny Fiedler\*<sup>1</sup>, Luisa Herrera<sup>1</sup>, Romina Rojas-Ponce<sup>2</sup>  
Institutions: <sup>1</sup>UCH Universidad de Chile, Santiago; <sup>2</sup>UCON Universidad de Concepción, Concepción, Chile
- **Group 4**  
Authors: Alba P Sarmiento\*, Angélica Borbón  
Institution: PUJ Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- **Group 5**  
Authors: Ramiro Barrantes\*, Gerardo Jiménez-Arce, Carolina Céspedes-Garro\*  
Institution: UCR Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
- **Group 6**  
Authors: Idania Rodeiro\*<sup>1</sup>, Mayra Álvarez<sup>2</sup>, Bárbaro Pérez<sup>2</sup>, Luis R Calzadilla<sup>3</sup>, René Delgado<sup>4</sup>, Diadelis Remírez<sup>5</sup>  
Institutions: <sup>1</sup>CEBIMAR; <sup>2</sup>Facultad de Medicina Calixto García; <sup>3</sup>Centro Comunitario de Salud Mental La Habana Vieja; Centro para las Investigaciones y Desarrollo de los Medicamentos, <sup>4</sup>CIDEM; Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos; <sup>5</sup>CEMED, La Habana, Cuba
- **Group 7**  
Authors: Enrique Terán\*<sup>1,2</sup>, Natalia Heras<sup>2</sup>, Leonardo J Beltrán<sup>2</sup>, Francisco Hernández<sup>3</sup>  
Institutions: <sup>1</sup>USFQ Universidad San Francisco de Quito; <sup>2</sup>UCE Universidad Central de Ecuador, Quito; <sup>3</sup>UG Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador
- **Group 8**  
Authors: Rocío Ortiz-López\*, Augusto Rojas-Martínez, Lourdes Garza-Ocañas, Yadira X Pérez-Páramo  
Institution: UANL Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México
- **Group 9**  
Authors: Marisol López-López\*<sup>1</sup>, Alberto Ortega-Vázquez<sup>1</sup>, Elisa Alonso-Vilatela<sup>2</sup>, Nancy Monroy-Jaramillo<sup>2</sup>, Teresa Corona Vázquez<sup>2</sup>, Petra Yescas-Gómez<sup>2</sup>, Adriana Ochoa-Morales<sup>2</sup>  
Institutions: <sup>1</sup>UAM Universidad Autónoma Metropolitana; <sup>2</sup>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, México DF, México
- **Group 10**  
Authors: Martha G Sosa-Macías\*, Carlos Galaviz-Hernández, Ismael Lares-Aseff; Blanca P Lazalde-Ramos  
Institution: IPN Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR, Durango, México
- **Group 11**  
Author: Ronald Ramirez-Roa\*  
Institution: UNAN Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua
- **Group 12**  
Authors: Manuela Grazina\*  
Institution: UC.PT University of Coimbra, Portugal
- **Group 13**  
Authors: Adrián Llerena\*, Pedro Dorado, Eva M Peñas-Lledó, Jesús Cobaleda, M Eugenia G Naranjo, Fernando de Andrés  
Institutions: UEX University of Extremadura, Badajoz, Spain
- **Group 14**  
Authors: Francisco E. Estévez-Carrizo\*, Nicolás González-Vacarezza  
Institution: UM Universidad de Montevideo, Uruguay