

Carlos Ruiz. Progenika Biopharma S.A.

La identificación sistemática y el análisis funcional de genes humanos están **revolucionando el estudio de los procesos de las enfermedades y el desarrollo del uso racional de los fármacos**. Permite al clínico hacer valoraciones fiables del riesgo que sufre un individuo de adquirir una enfermedad particular; aumenta el número y la especificidad de las dianas de los fármacos y explica la variación interindividual de la efectividad terapéutica y la toxicidad de los fármacos.

## Desarrollo de **herramientas de identificación de polimorfismos relacionados con reacciones adversas a fármacos**: un nuevo paso hacia la medicina personalizada

El conocimiento de las variaciones heredadas de respuesta frente a fármacos, que son constantes a lo largo de la vida, puede ayudar a ajustar la dosis basándose en el perfil genético y prevenir las reacciones adversas a fármacos.

La tecnología DNChip permite la identificación simultánea de un gran número de estas variaciones con alta sensibilidad y especificidad, por lo que se ha convertido en una poderosa herramienta diagnóstica en el ámbito de la medicina personalizada.

### 1. Variabilidad en la respuesta de los pacientes a los fármacos

La variabilidad entre individuos en la respuesta a fármacos es un grave problema en la práctica clínica y en el desarrollo de fármacos. Puede conducir a un fracaso terapéutico (tabla 1) o, lo que es peor, a efectos adversos en individuos o subpoblaciones de pacientes. El acontecimiento de reacciones adversas graves o fatales ha sido analizado extensamente en pacientes hospitalizados. Un meta-análisis de 39 estudios de hospitales estadounidenses sugiere que el 6,7% de los pacientes ingresados sufre reacciones adversas y 0,32% sufre reacciones fatales, causando 2 millones de hospitalizaciones y 100.000 muertes al año en EE.UU. Esta cifra sitúa a las reacciones adversas entre la cuarta y la sexta causa de muerte en pacientes hospitalizados por delante de las enfermedades pulmonares, diabetes, SIDA, neumonía y

**TABLA 1. TASAS DE EFICACIA PARA DISTINTAS ÁREAS TERAPEÚTICAS.**

Área Terapéutica	Eficacia (%)
Alzheimer	30
Analgésicos	80
Asma	60
Arritmias cardíacas	60
Depresión (SSRI)	62
Diabetes	57
Hepatitis C	47
Incontinencia	40
Migraña (aguda)	52
Migraña (profilaxis)	50
Oncología	25
Osteoporosis	48
Artritis reumatoide	50
Esquizofrenia	60

Adaptado de Spear (2001)  
Trends Mol Medicine 7:201-206

accidentes de tráfico<sup>(1)</sup>.

En España, cinco de cada cien ingresos en los servicios de urgencias de hospitales públicos del país se deben a reacciones adversas a fármacos y entre el 10 y 20 por ciento de los pacientes hospitalizados sufren este percance al recibir la medicación, de los cuales el 1 por ciento muere como consecuencia de este hecho<sup>(2)</sup>.

Los factores de riesgo potencial de que un fármaco sea ineficaz o tóxico incluyen interacciones fármaco-fármaco, la edad del paciente, enfermedades renales, hepáticas o de otro tipo y variables del estilo de vida tales como el consumo de tabaco y alcohol. Pero por otra parte, los factores genéticos que

afectan a la cinética y dinámica de numerosos fármacos son incluso más importantes en la determinación del riesgo individual. Así, cambios en la secuencia de DNA en genes que codifican enzimas metabolizadoras, receptores y transportadores de fármacos se han asociado con la variabilidad individual en la eficacia y toxicidad de los fármacos<sup>(3-7)</sup>.

La principal diferencia entre los factores genéticos y los ambientales es que la variación en una mutación o rasgo heredado está presente a lo largo de toda la vida y sólo tiene que ser examinada una vez, mientras que los efectos medioambientales están cambiando continuamente.

### 2. Farmacogenética

La secuenciación del genoma humano y su comparación entre los distintos individuos permitió identificar un gran número de cambios en la secuencia del DNA. La mayor parte de estos cambios son lo que se denomina en inglés SNPs, single nucleotide polymorphisms, es decir cambios de un solo nucleótido. Ellos son los principales responsables de por qué una pequeña proporción de la población podría tener un riesgo mayor de sufrir ineficacia o toxicidad a fármacos. El estudio de tales polimorfismos, y su correlación con la respuesta a fármacos ha dado lugar al campo de la farmacogenética<sup>(3-7)</sup>.

Cuando se comparan los genomas de dos individuos no relacionados, los SNPs ocurren cada 100-1.500 pares de bases (pb). Dos individuos cualesquiera difieren en 3 millones de

**TABLA 2. EJEMPLO DE ALGUNOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS CON IMPORTANCIA CLÍNICA DEL METABOLISMO DE FÁRMACOS QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA A ESTOS.**

Enzima	Frecuencia polimorfismo	Fármaco	Efecto del fármaco
CYP2C9	14-28% (heterocigotos) 0.2-1% (homocigotos)	Warfarina	Hemorragia
		Tolbutamida	Hipoglucemia
		Fenitoína	Toxicidad fenitoína
		Glipizida	Hipoglucemia
		Losartan	Efecto antihipertensivo disminuido
CYP2D6	5-10% (metabolizadores pobres) 1-10% (metabolizadores ultrarrápidos)	Antiarrítmicos	Efectos proarrítmicos y otros efectos tóxicos
		Antidepresivos	Toxicidad en metabolizadores pobres e ineficacia en metabolizadores ultrarrápidos
		Antipsicóticos	Discinesia tardía
		Opiodes	Ineficacia de codeína como analgésico, efectos secundarios narcóticos, dependencia
		Antagonistas (-adrenoceptor	(-bloqueo aumentado
CYP2C19	3-6% (caucásicos) 8-23% (asiáticos)	Omeprazol	Índices de curación mayores cuando administrado con claritromicina
		Diazepam	Sedación prolongada
Pseudocolinesterasa plasmática	1.5%	Succinilcolina	Apnea prolongada
N-acetiltransferasa	40-70% (caucásicos) 10-20% (asiáticos)	Sulfonamidas	Hipersensibilidad
		Amonafida	Mielotoxicidad (acetiladores rápidos)
		Procainamida, hidralazina, isoniazida	Lupus eritomatoso inducido por los fármacos
Tiopurina metiltransferasa	0.3%	Mercaptopurina, tioguanina, azotioprina	Mielotoxicidad
UDP-glucuronosiltransferasa	10-15%	Irinotecan	Diarrea, mielosupresión

pb, esto es el 0,1% del genoma haploide. Una vez identificados estos SNPs y sus frecuencias en diferentes poblaciones, se pueden emplear para correlacionar la huella genética del paciente con la respuesta probable del individuo a los distintos fármacos<sup>(8)</sup>. Los SNPs en regiones codificantes (30.000-100.000 por genoma) pueden causar cambios en aminoácidos y en la función de las proteínas o pueden ser neutrales. SNPs dentro de genes o en regiones reguladoras pueden provocar diferencias en la expresión de proteínas. Los proteomas de dos individuos pueden diferir en 30.000 proteínas, y algunas de estas diferencias podrían afectar a la respuesta inducida por fármacos. Es decir, que la capacidad de predecir diferencias interindividuales en la eficacia o toxicidad de fármacos basándose en factores genéticos es una perspectiva realista en el tratamiento con fármacos.

Los dos alelos que lleva cada individuo para el locus de un gen determinado (genotipo) se pueden identificar mediante el análisis del DNA. La influencia del genotipo sobre la cinética del fármaco o la función del receptor, el fenotipo, pueden ser medidos por métodos analíticos avanzados para la detección de metabolitos o por sofisticadas investigaciones clínicas, como por ejemplo estudios de densidad de receptores por PET (tomografía de emisión de positrones). Por otra parte, el desarrollo durante los últimos años de herramientas como los DNACHIPS o DNA microarrays, han revolucionado los estudios farmacogenéticos al permitir la determinación

simultánea del genotipo de miles de SNPs con gran sensibilidad y especificidad.

La farmacogenética tuvo su comienzo en los años 50 cuando se descubrió que algunas reacciones adversas podrían estar causadas por variaciones en la actividad enzimática de origen genético. Los primeros estudios moleculares en farmacogenética comenzaron con el clonaje y caracterización del gen del citocromo P450 CYP2D6 a finales de los años 80 (9-10). Actualmente, se han extendido a otros genes humanos, como los que codifican para muchos de los enzimas implicados en el metabolismo de fármacos y receptores para neurotransmisores, y algunos de los sistemas de transporte o recaptación celular.

Por ejemplo, se han descrito más de 70 variantes alélicas del citocromo P450 CYP2D6, de los cuales al menos 15 codifican productos génicos aparentemente no funcionales. Estos alelos se diferencian del gen normal (wild-type) principalmente en una o más mutaciones puntuales o SNPs (denominamos SNP si la frecuencia de cada uno de los dos alelos es superior al 1% y mutación si la frecuencia de uno de ellos es inferior al 1%), aunque también pueden ser deleciones, duplicaciones o multiplicaciones del gen. Estas variantes pueden no tener efecto sobre la actividad enzimática, o bien pueden codificar para enzimas con una actividad disminuida o ausente. De este modo, se considerarán metabolizadores extensivos a aquellos individuos homocigotos para la actividad normal del enzima (75-85% de la población) y metabolizadores intermedios (10-15%) o

metabolizadores pobres (5-10%) a los que son portadores de alelos con actividad disminuida o alelos con pérdida de función del enzima. Los metabolizadores ultrarrápidos (1-10%) son portadores de genes activos duplicados o multiplicados<sup>(13)</sup>.

Los polimorfismos genéticos (tabla 2) que afectan la cinética y toxicidad de los fármacos se pueden clasificar según los efectos que producen sobre:

- **Metabolismo de los fármacos**  
El metabolismo aumentado o disminuido de un fármaco puede cambiar las concentraciones de ese fármaco, así como aquellos de sus metabolitos activos, inactivos o tóxicos. De este modo, el papel cuantitativo de un enzima metabolizador de fármaco, o los mecanismos de recaptación de fármaco en la cinética general y el rango terapéutico del agente determinarán cuánto tiene que ser ajustada la dosis en metabolizadores lentos o ultrarrápidos.

El ejemplo del polimorfismo de CYP2D6 vuelve a proporcionar una evidencia clínica de estos conceptos; la mayoría de los pacientes (90%) requiere 75-150 mg/día de nortriptilina para alcanzar una concentración "terapéutica" estable en plasma de 200-600 nmol/l pero los metabolizadores pobres sólo necesitan 10-20 mg/día para alcanzar la misma concentración. Por otro lado, los metabolizadores ultrarrápidos necesitarían 300-500 mg/día o incluso una dosis mayor para alcanzar la misma concentración plasmática<sup>(11-12)</sup>.

Obviamente, si se desconoce el genotipo o

# Biotecnología

**TABLA 3. EJEMPLOS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS CON RELEVANCIA CLÍNICA QUE AFECTAN A DIANAS TERAPÉUTICAS Y TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS** <sup>(15-17)</sup>.

Gen	Frecuencia	Fármaco	Efecto
Glicoproteína P (MDR1)	24%	Digoxina	Concentraciones aumentadas de digoxina en plasma
Receptor adrenérgico (2)	37%	Albuterol	Respuesta disminuida a agonistas adrenérgicos (2)
Receptor sulfonilurea	2-3%	Tolbutamida	Respuesta disminuida a insulina

fenotipo del paciente, a los metabolizadores pobres se les suministrará una sobredosis y tendrán un alto riesgo de sufrir toxicidad, mientras que a los metabolizadores ultrarrápidos se les suministrará una dosis inferior a la terapéutica.

La situación es diferente cuando el efecto terapéutico depende de la formación de un metabolito activo (por ejemplo, la morfina en codeína). Los metabolizadores pobres no obtendrán el efecto del fármaco y los metabolizadores ultrarrápidos tendrán respuestas exageradas al fármaco <sup>(14)</sup>.

- Transportadores de fármacos
- Algunos transportadores de membrana están implicados en la absorción de fármacos a través del tracto intestinal, en la absorción en el cerebro y en otros tejidos, y en el transporte a sitios específicos de acción, por ejemplo la hendidura sináptica. Sin embargo, poco se conoce sobre las variantes de transportadores en relación a la respuesta a fármacos.
- Una de estas variantes ha sido descubierta recientemente en el gen MDR1, que codifica para la glicoproteína P, cuya función es exportar numerosos fármacos desde el interior de las células al exterior, protegiéndolas de la acumulación de sustancias tóxicas o metabolitos. Una mutación en el exón 26 del gen MDR1 (C3435T) correlaciona los niveles de expresión y la función intestinal de la glicoproteína P.
- Dianas o receptores
- Los efectos de la mayoría de los fármacos se ejercen por la interacción de los compuestos con receptores de membrana (aproximadamente el 50% de los fármacos), enzimas (aproximadamente 30%) o canales iónicos (aproximadamente 5%). Polimorfismos en los genes que codifican para estas proteínas podrían alterar la respuesta al fármaco. Ejemplos clínicamente importantes se listan en la Tabla 3.

Los criterios relacionados con un fármaco que hacen que un polimorfismo genético sea clínicamente relevante y sea importante su identificación son que el fármaco presente un rango terapéutico estrecho o que exista una gran variación interindividual en la cinética o sospecha de sobredosis. De ahí la importancia de la determinación de estos polimorfismos, especialmente de aquellos responsa-

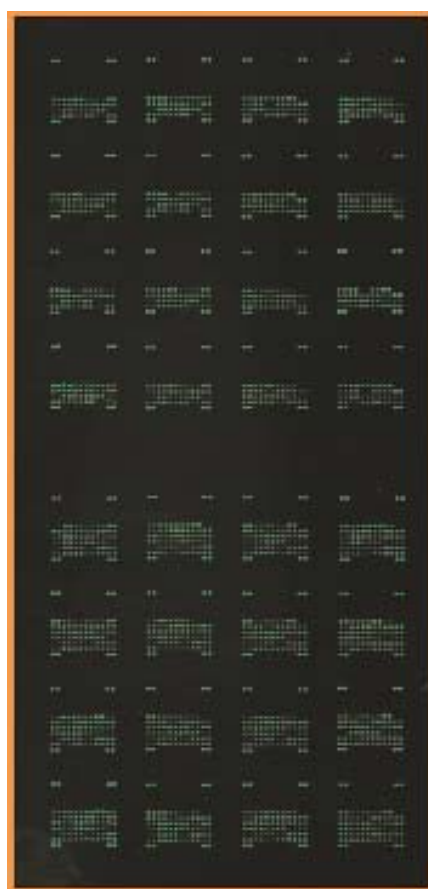
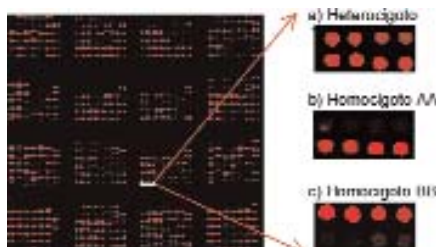


Imagen de un microarray al iluminar con el láser. Se pueden observar los puntos donde están representadas cada una de las secuencias de DNA que se quieren analizar. La señal indica la intensidad de la hibridación.

bles de fenotipos extremos, con la ventaja de que suponen la realización de un único test de DNA una vez en toda la vida del paciente.

### 3. DNA Arrays

En el año 2001, el Consorcio para el Proyecto Genoma Humano y la empresa privada Celera presentaron el primer borrador completo del genoma humano. Este primer borrador permitió estimar que el genoma humano contiene aproximadamente 30.000 genes. La

humanidad entraba en la era de la investigación a gran escala o lo que se denomina el "high-throughput". Y es que a partir de este momento, los tediosos estudios de análisis de la expresión de un pequeño número de genes o sus variantes relacionados con una enfermedad determinada han quedado obsoletos ya que se ha abierto la puerta al estudio completo del genoma humano.

Los microarrays, DNACHIPS, DNAarrays o biochips son herramientas que la genómica funcional puede usar para los estudios a gran escala que se plantean en la actualidad.

Dos avances marcaron el arranque definitivo de los microarrays. Por una parte el uso de un soporte sólido no poroso, como el vidrio, que facilitó la miniaturización y la detección basada en fluorescencia. Por otra parte, la adaptación de técnicas fotolitográficas utilizadas en la elaboración de semiconductores o de técnicas de deposición o "spoteo" para la producción de microarrays conteniendo cada uno de ellos hasta cientos de miles de oligonucleótidos distintos, cada uno en una región tan pequeña como 20 µm<sup>2</sup>; los denominados microarrays de alta densidad.

Concretamente un microarray es un soporte sólido (ver Figura 1) que contiene miles de fragmentos de secuencias de genes diferentes representadas en forma de DNA, cDNA u oligonucleótidos inmovilizadas o unidas en su superficie en posiciones fijas. Los soportes son generalmente portaobjetos de vidrio para microscopio, membranas de nylon o chips de silicio. Es importante que estas secuencias o sondas estén unidas al soporte en un orden fijo ya que la localización robotizada de cada uno de ellos determina el gen cuya expresión se está midiendo.

En el caso de los microarray para el estudio de mutaciones o SNPs se trata de una superficie de cristal en la que está depositado un gran número de secuencias génicas complementarias de cada una de las mutaciones que se desea estudiar. Una de las aproximaciones es hibridar estas secuencias que reconocen específicamente al alelo normal y al mutado con fragmentos de DNA, procedentes de la muestra que se va a analizar, amplificados mediante la técnica de PCR y marcados con una molécula fluorescente <sup>(18)</sup>. Al iluminar el microarray con el láser podemos identificar a qué secuencias se ha unido la muestra pro-

ABCB1	Glicoproteína P1	C3435T
ADD1	Aducina 1 (alfa)	Gly460Trp
ADRB1	Receptor adrenérgico beta 1	Arg389Gly
ADRB2	Receptor adrenérgico beta 2	Arg16Gly, Gln27Glu
AGT	Angiotensinógen	Met235Thr
AGTR1	Receptor angiotensinógeno	A1166C
APOE	Apolipoproteína E	*E2, *E3, *E4
BCHE	Butirilcolinesterasa	Asp70Gly, Ala539Thr
BDKRB2	Receptor bradiquinina B2	C-58T
COMT	Catecol O metiltransferasa	Val180Met
CYP1A1	Citocromo P450 1A1	Ile462Val
CYP1A2	Citocromo P450 1A2	*1, *1C, *1F, *7, *11
CYP2B6	Citocromo P450 2B6	6-7 519C/T.
CYP2C19	Citocromo P450 2C19	*1, *2, *3, *4, *5, *7, *8, *9, *10
CYP2C8	Citocromo P450 2C8	*1, *2, *3, *4
CYP2C9	Citocromo P450 2C9	*1, *2, *3, *4, *5, *6
CYP2D6	Citocromo P450 2D6	*1, *2, *3, *4, *5 (gene deletion), *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14A, *14B, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *36, *40, *41, gene duplication *1XN, *2XN, *4XN, *10XN, *17XN, *35XN, *41XN
CYP3A4	Citocromo P450 3A4	*1, *1B
CYP3A5	Citocromo P450 3A5	*1, *3, *6, *8, *9, *10
DRD3	Receptor dopaminérgico D3	Ser9Gly
GRIN2B	Receptor glutamatérgico NMDA 2B	C2664T
GSTM1	Glutation transferasa M1	Null allele
GSTM3	Glutation transferasa M3 (brain)	*B
GSTP1	Glutation transferasa-pi	Ile405Val
GSTT1	Glutation transferasa-n1	Null allele
HTR2A	Receptor serotoninérgico 5HT2A	His452Tyr, T102C
IL10	Interleucina 10	G-1082A
MTHFR	5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa	C677T
NAT2	N-acetiltransferasa 2	*4, *5A, *5B, *5C, *6A, *7B, *12A, *14A, *14B
SLC6A4	Transportador de serotonina	44 bp deletion
TNF	Factor de necrosis tumoral TNF	G-380A
TPMT	Tiopurina metiltransferasa	*1, *3A, *3B, *3C
XRCC1	Proteína de reparación de DNA XRCC1	Arg399Gln

blema y discriminar específicamente entre un paciente normal, un heterocigoto y un homocigoto (ver imagen en página anterior).

#### 4. Drugchip

Progenika Biopharma, S.A. es una empresa pionera en el desarrollo de herramientas de medicina personalizada. Fruto de su actividad de I+D es el lanzamiento al mercado de DNACHIPS con el marcado CE para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar o la enfermedad inflamatoria intestinal (18). Recientemente Progenika ha desarrollado un DNACHIP para la identificación de los principales polimorfismos relacionados con reacciones adversas a fármacos. Se trata de una herramienta farmacogenética que permite identificar polimorfismos en genes como enzimas de fase I (citocromo P450s), enzimas de fase II, transportadores de fármacos, receptores de fármacos y otras dianas terapéuticas.

En concreto DRUGCHIP identifica 90 polimorfismos en 32 genes:

El incremento de estudios relacionados con la farmacogenética y su aplicación en la práctica clínica cobra cada día más relevancia. A continuación se destacan algunos ejemplos de la utilidad de esta nueva herramienta en la rutina diaria de diferentes especialidades:

- **PSIQUIATRÍA:** En función de la actividad enzimática de un individuo se pueden indicar ajustes de dosis para diferentes antidepresivos y antipsicóticos con el fin de evitar problemas de baja eficacia terapéutica o de reacciones adversas (19).
- **ANTIRETROVIRALES:** Ejemplos como Efavirenz (inhibidor de la transcriptasa inversa del virus VIH), el estudio de los genes CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, MDR1 permitiría identificar aquellos pacientes en los que es preciso evitar que los niveles del fármaco en sangre se mantengan anormalmente

altos dando lugar a toxicidad en el Sistema Nervioso Central (SNC) (20).

- **HEMATOLOGÍA:** En pacientes tratados con anticoagulantes orales como la warfarina y el acenocumarol. Hay evidencias de un aumento en el riesgo de padecer hemorragias en pacientes tratados que presentan una actividad de CYP2C9 baja (21).
- **ONCOLOGÍA:** Hay diferentes estudios relacionados con el CYP2D6, tamoxifeno y el cáncer de mama así como la influencia de la glicoproteína-P en el metabolismo de fármacos más recientes como el irinotecan (22). Otros fármacos de interés serían el 5-fluorouracilo y los derivados del taxol y el platinato.

#### Bibliografía

- 1- Lazarou et al., (1998); JAMA; 15;279(15):1200-5.
- 2- Diario Médico., 18 de Julio de 2000.
- 3- Meyer et al., (1991); Pharmacogenetics 1: 66-67.
- 4- Meyer UA., (2000); Drugs in special patient groups: clinical importance of genomics in drug effects. In: Carruthers GS, Hoffmann BB, Melmon KL, Nierenberg DW, eds. New York: McGrawHill, 1179-205.
- 5- Ingelman-Sundberg et al., (1999); Trends Pharmacol Sci; 20: 342-49.
- 6- Evans et al., (1999); Science 286: 487-91.
- 7- Roses et al., (2000); Lancet; 355: 1358-61.
- 8- Brookes et al., (1999); Gen; 243: 177-86.
- 9- Meyer et al., (1997); Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997; 37: 269-96.
- 10- González et al., (1988); Nature 1988; 331: 442-46.
- 11- Bertilsson et al., (1997); Acta Psychiatr Scand; 96: 14-21.
- 12- Dalen et al., (1998); Clin Pharmacol Ther; 63: 444-52.
- 13- Raimundo et al., (2000); Pharmacogenetics; 10: 1-5.
- 14- Sindrup et al., (1995); Pharmacogenetics;5(6):335-46.
- 15- Hoffmeyer et al., (2000); Transplantation. Aug 15;70(3):522-5.
- 16- Liggett et al., (2000); J Allergy Clin Immunol; 105: 487-92.
- 17- Hansen et al., (1998); Diabetes; 47: 598-605
- 18- Tejedor et al., (2005); Clin Chem 51: 7; 137-144.
- 19- Kircheiner et al., (2004); Mol Psychiatry; May;9 (5):442-73. Review.
- 20- Rodriguez-Novoa et al., (2006); The Pharmacogenomics Journal 6, 234-245.
- 21- Hillman MA et al., (2005); Clin Med Res; Aug;3(3):137-45.
- 22- Efferth T et al., (2005); Pharmacology Therapeutics; 107: 155-76.