



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**PRESENCIA DE MUTACIONES EN LA REGIÓN EXÓNICA 7  
DEL GEN CYP2D6 EN POBLACIONES PERUANAS Y SU  
POSIBLE APLICACIÓN EN LA SALUD PÚBLICA**

**PRESENTADA POR  
Youn Ho Kim**

**TESIS PARA OPTAR PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
MÉDICO CIRUJANO**

**LIMA – PERÚ**

**2014**



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada  
CC BY-NC-ND**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**USMP** | FACULTAD DE  
UNIVERSIDAD DE SAN MARTÍN DE PORRES | **MEDICINA HUMANA**

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
SECCIÓN DE PRE GRADO

***“PRESENCIA DE MUTACIONES EN LA REGIÓN EXÓNICA 7  
DEL GEN CYP2D6 EN POBLACIONES PERUANAS Y SU POSIBLE  
APLICACIÓN EN LA SALUD PÚBLICA”***

**TESIS**

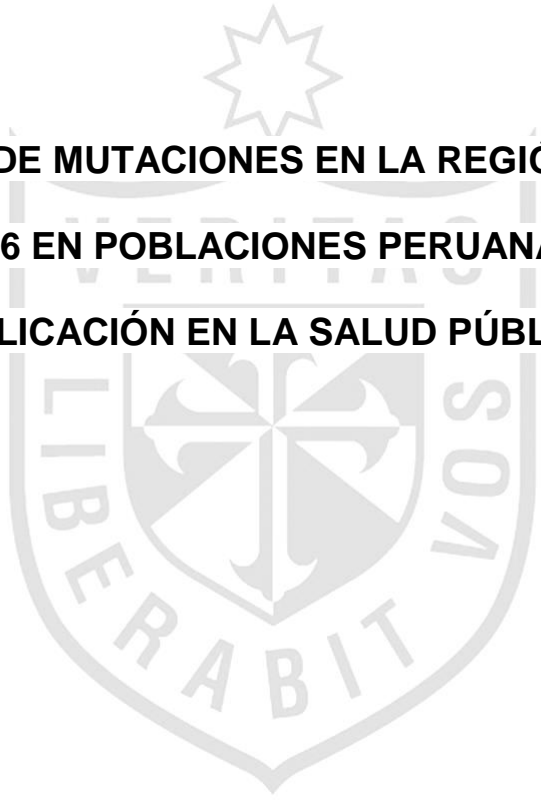
**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
MÉDICO CIRUJANO**

**PRESENTADO POR**

**Youn Ho Kim**

**LIMA – PERÚ**

**2014**



**PRESENCIA DE MUTACIONES EN LA REGIÓN EXÓNICA 7  
DEL GEN CYP2D6 EN POBLACIONES PERUANAS Y SU POSIBLE  
APLICACIÓN EN LA SALUD PÚBLICA**

## **ASESORES Y MIEMBROS DEL JURADO**

### **ASESOR:**

**Dr. Salazar-Granara, Alberto**

Médico, Docente investigador, Instituto de Investigación, FMH – USMP

### **PRESIDENTE DEL JURADO:**

**Dr. Benjamín Castañeda Castañeda**

Director del Instituto de Investigación

Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

### **MIEMBROS DEL JURADO:**

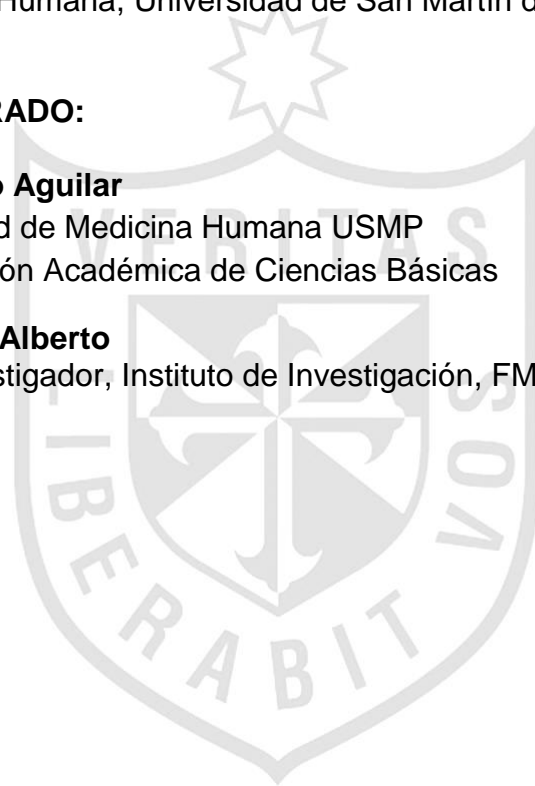
**Dr. José Carhuancho Aguilar**

Docente de la Facultad de Medicina Humana USMP

Asistente de la Dirección Académica de Ciencias Básicas

**Dr. Salazar-Granara, Alberto**

Médico, Docente investigador, Instituto de Investigación, FMH – USMP



## DEDICATORIA

A mi querida familia por su incondicional apoyo,  
a mis padre Won kyun porque que dio la fortaleza para seguir adelante  
y esforzarme siempre para lograr mis metas,  
a mi abuela in song porque me inspira a ser mejor día a día.

Espero poder llenarlos siempre de orgullo.



## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de alguna forma a la realización de esta Tesis

Quiero agradecer a mi asesor Dr. Alberto Salazar por el tiempo y paciencia puesto en este trabajo, sin duda su apoyo y guía fue fundamental para poder culminar con éxito esta investigación.

Al blgo Daniel Ore por su gran contribución, asesoramiento y ayuda en la realización de esta Tesis

A todos los voluntarios que han participado, sin cuya colaboración no hubiera sido posible la realización de los estudios de esta Tesis

Agradezco también a la Universidad de San Martín de Porres y al Instituto de Investigación de la universidad por haberme permitido trabajar en el Centro de Genética y Biología Molecular USMP, donde esta investigación se llevó a cabo

## ÍNDICE

PORTADA	I
TÍTULO	II
ASESOR Y MIEMBROS DEL JURADO	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE CONTENIDO	VI
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
GLOSARIO DE TERMINOS	X
I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- MATERIAL Y METODO .....	6
III.- RESULTADOS.....	12
IV.- DISCUSION.....	30
V.- CONCLUSIONES.....	34
VI.- RECOMENDACIONES.....	35
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	36



## ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1: Frecuencia global de alelos y genotipos de los polimorfismos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos según la posiciones nucleotidas ----- 12
- Tabla nº 2: Frecuencia de haplotipos y genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos, según combinación de nucleótidos ----- 15
- Tabla 3. Frecuencias comparativas de los alelos y genotipos de exón 7 del gen cyp2d6, entre pobladores peruanos de las regiones de la costa (Lima y San Jose-Lambayeque), sierra (Apurímac y Lago Titicaca-Puno) y selva (Lamas-San Martin, Amazonas y Andoas-Loreto) ----- 18
- Tabla 4. Frecuencia por pobladores de haplotipos y genotipos del gen CYP2D6 en pobladores peruanos, según combinación de nucleótidos----- 27
- Grafico nº 1: Frecuencia global de alelos de exón 7 de gen cyp2d6 en pobladores peruanos ----- 13
- Grafico nº 2: frecuencia global de genotipos de exón 7 del gen cyp2d6 en pobladores peruanos ----- 14
- Grafico nº 3: frecuencia global de los haplotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos ----- 16
- Grafico nº4: Frecuencia de los metabolizadores de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos ----- 17
- Grafico nº5: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Amazona ----- 19
- Grafico nº6: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Amazona ----- 19

- Grafico nº7: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Apurímac ----- 20
- Grafico nº8: Frecuencia de los genotipos del gen CYP2D6 en pobladores de Apurímac ----- 21
- Grafico nº9: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Lambayeque ----- 21
- Grafico nº10: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Lambayeque ----- 22
- Grafico nº11: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Lima ----- 22
- Grafico nº12: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Lima ----- 23
- Grafico; nº13 Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Loreto ----- 24
- Grafico nº14: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Loreto ----- 25
- Grafico nº15: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Puno ----- 26
- Grafico nº16: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores de Puno ----- 26
- Grafica nº 17 Frecuencias por pobladores de los metabolizadores de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos ----- 29

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de mutaciones en el exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos y su posible implicancia en la salud pública

**Material y Método:** A 46 individuos peruanos procedentes de Andoas-Loreto, Chachapoyas-Amazonas, Abancay-Apurímac, Uros-Puno, San José-Lambayeque, y Lima-Lima, previo consentimiento informado, se les recolecto muestras sanguíneas y de hisopado bucal. La extracción del ADN fue realizada por técnica convencional. Por PCR se amplifico el exón 7 del gen *CYP2D6*, y se determinó los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* por análisis de secuenciamiento genético, para este fin se emplearon herramientas de bioinformática de acceso libre en Internet.

### Resultados:

Se encontró la presencia de los siguientes polimorfismos: rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293 y rs61745683 y se descubrieron 3 nuevos polimorfismo donde hemos calificados como Nuevo 1, Nuevo 2, y Nuevo 3. Se reporta un solo probable haplotipo conocido que es \*56. Asimismo, se descubrieron 5 nuevos haplotipos lo cual fueron nombrados como desconocido 1, desconocido 2, desconocido 3, desconocido 4 y desconocido 5. Se presenta una frecuencia de individuos con genotipo metabolizador lento que represento el 13 %, asimismo, se resalta la presencia de un 87 % de individuos sin fenotipo metabolizador definido

**Conclusión:** Finalmente, se detectó la presencia de alelos y genotipos metabolizadores lentos en pobladores peruanos.

**Palabras Claves:** Gen, *CYP2D6*, exón 7, Genotipo, Alelo, metabolizador lento, Población Peruana,

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the frequency of mutations in exon 7 of the CYP2D6 gene in Peruvian people and their possible implications on public health.

**Materials and methods:** Forty six individuals from Andoas-Loreto, Chachapoyas-Amazonas, Abancay-Apurímac, Uros-Puno, San Jose-Lambayeque and Lima-Lima, who had been previously informed and had given their consent, participated in the study. We collected blood and buccal samples next extracted DNA by conventional technique. It was use PCR technique was used for amplifying the specific exon 7 region of the CYP2D6 gene. The CYP2D6 gene polymorphisms were determined by genetic sequencing analysis, For this purpose some free available bioinformatics tools were used on internet.

**Results:** The following polymorphisms were observed: rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293, rs61745683 and three new haplotypes (New A, B and C). We are reporting about a known haplotype which is \*56, and five new haplotypes (Unknown 1, 2, 3, 4 and 5). It has a frequency of individuals with slow metabolizer genotype of 13% compared to 87% of individuals with no defined metabolizer phenotype.

**Conclusion:** We have revealed the presence of the people's slow metabolizer in Peruvian populations

**Keywords:** Gene, CYP2D6, exon 7, Genotype, Allele, slow metabolizer, Peruvian Population

## GLOSARIO DE TERMINOS

**Cromosoma:** es una ordenación lineal de DNA y proteínas (cromatina), es decir, es una ordenación lineal de genes

**ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Ácido nucleico de los cromosomas, que contiene la información genética codificada

**Nucleótido:** Unidad básica del ADN. Consiste en la unión de un glúcido (pentosa), un ácido fosfórico y una base nitrogenada

**Gen:** Es una región de ADN que codifica para ARN.

**Alelo:** Es cada una de las variantes de un locus. Cada alelo aporta diferentes variaciones al carácter que afecta. En organismos diploides ( $2n$ ) los alelos de un mismo locus se ubican físicamente en los pares de cromosomas homólogos

**Haplotipo:** es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci. En un segundo significado, un haplotipo es un conjunto de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en un cromosoma particular que están estadísticamente asociados

**Homocigoto:** Individuo puro para uno o más caracteres, es decir, que en ambos loci posee el mismo alelo (representado como aa en el caso de ser recesivo o AA si es dominante). El individuo ha heredado dos copias idénticas del gen, una de cada parental

**Heterocigoto:** Individuo que para un gen, tiene un alelo distinto en cada cromosoma homólogo. El individuo ha heredado una copia distinta de cada parental. Su representación mendeliana es "Aa".

**Genotipo:** es el conjunto de los factores hereditarios internos de un organismo, sus genes y por extensión su genoma.

**Fenotipo:** es el conjunto de las cualidades físicas observables en un organismo, incluyendo su morfología, fisiología y conducta a todos los niveles de descripción.

**Mutación:** es una alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo (muchas veces por contacto con mutágenos) y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características de éste, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia.

**Polimorfismo de un solo nucleótido o SNP:** es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma

**PCR:** Siglas de Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa) Procedimiento de laboratorio que permite sintetizar ADN "in vitro". Permite obtener un número muy elevado de copias de un segmento de ADN (amplificación de ADN) en un tiempo muy corto, a partir de una pequeña cantidad de ADN

## I.- INTRODUCCION

La farmacogenética es el estudio de las variaciones hereditarias (genes), que expresan proteínas que interactúan con el fármaco en los procesos de la farmacocinética y farmacodinamia. Debido a la importancia de este campo, surge el concepto de medicina personalizada, la cual promueve la elección de los fármacos según la constitución genética del individuo.<sup>1,2,3</sup>

Aproximadamente el 50% de los fármacos que consume el hombre, son metabolizados por las enzimas del complejo citocromo P450 o CYP, así también, otros xenobióticos procedentes de alimentos y el medio ambiente, y endobióticos producidos en el propio hombre.<sup>4</sup>

El complejo enzimático del CYP-450, consta de 144 enzimas distribuidas en diversos tejidos y órganos, especialmente en las membranas del retículo endoplasmático liso del hígado<sup>21</sup>, éstas se clasifican por familias, mediante un número arábigo precedido de la sigla CYP, por ejemplo, CYP1, CYP3, etc.<sup>5</sup>

Por otra parte, existen subfamilias, las que se identifican mediante la adición de una letra mayúscula, por ejemplo, CYP3A, CYP2C, CYP2D<sup>21</sup>, a su vez estas subfamilias se sub-clasifican en diversas isoformas, añadiendo un número arábigo, por ejemplo CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, entre otros, resaltando a las subfamilias CYP3A Y CYP2D como las más abundantes en los humanos, y las que desempeñan un efecto importante en el metabolismo de prácticamente más de la mitad de los medicamentos de uso común.<sup>5,6</sup>

Es de particular interés la enzima CYP2D6, cuyo gen lleva el mismo nombre (*CYP2D6*), esto se sustenta en que esta enzima interviene en las reacciones de

biotransformación de fase I, de una amplia gama de medicamentos de uso común, que en conjunto equivalen al 20-25% de los fármacos más utilizados en el hombre<sup>1,2</sup>, como por ejemplo: antihipertensivos, antidepresivos, antipsicóticos, analgésicos, anticonvulsivos, antihistamínicos, estimulantes, y otros.<sup>7,8</sup>

Está comprobado que la actividad cinética oxidativa de la isoforma CYP2D6 es heterogénea (fenotipo), característica que presenta un panorama en el cual los pacientes al recibir fármacos a dosis terapéuticas, pueden devenir en un efecto deseado o el indicado, pero también en efectos indeseados, que pueden ir desde ineficacia del fármaco, toxicidad y hasta letalidad.<sup>9</sup>

Así, en base al fenotipo de metabolizar de la isoforma CYP2D6, se reconocen 4 tipos del individuos; metabolizador lento, metabolizador intermedio, metabolizador extensivo (rápido) y metabolizador ultra-rápido; la mayoría de las dosis terapéuticas de los fármacos encajan con mejor seguridad para los individuos metabolizadores extensivos.<sup>10</sup>

Estas evidencias, han llevado a la individualización de diferentes fármacos empleados en la clínica, por ejemplo, el antidepresivo Nortriptilina, según estudios debe indicarse en diferentes dosis, según el tipo de metabolizador CYP2D6, así el individuo metabolizador lento CYP2D6 debería recibir una dosis de 20-50 mg, mientras que el metabolizador ultra-rápido, recibiría una dosis de 250-500 mg, manteniendo estas dosis individualizadas, se aseguraría la eficacia y la menor probabilidad de toxicidad por el fármaco.<sup>11</sup>

Otro ejemplo clínico del efecto del CYP2D6, es su uso en la decisión terapéutica del Tamoxifeno en pacientes mujeres con cáncer de mama estrógeno dependientes, así



son tributarias del uso de esta droga, aquellas pacientes con fenotipo metabolizador extensivo y ultra-rápido, mientras que en las pacientes metabolizadoras lentas, la eficacia de esta droga es pobre, y se recomienda el empleo de otros medicamentos como por ejemplo los inhibidores de la aromatasa.<sup>12</sup>

El origen del fenotipo de la enzima CYP2D6 se presenta en el gen *CYP2D6*, el cual es altamente polimórfico, es decir que presenta una amplia variabilidad de mutaciones, así, se conocen más de 70 variaciones alélicas (mutaciones) que codifican esta enzima en los diferentes grados de actividad antes mencionados, este conocimiento, ha permitido que en la actualidad se determine el tipo de metabolizador en base al análisis de las mutaciones del gen, comúnmente denominadas genotipos.<sup>13</sup>

Por tanto, el gen *CYP2D6* determina el tipo de metabolizador de fármacos, en base a sus mutaciones, así, este gen está conformado por 9 regiones exónicas funcionales, las que pueden presentar mutaciones como duplicaciones, deleciones, y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP o single nucleotide polymorphism), así por ejemplo, se sabe que los individuos que presenta duplicaciones del gen, presentaran un fenotipo metabolizador rápido y/o ultra-rápido, y en aquellos que presentan deleciones o SNP presentaran fenotipo metabolizador lento.<sup>14</sup>

Otro hecho importante, respecto a las variantes del gen *CYP2D6* (mutaciones), es que estas se encuentran en diferentes frecuencias según el grupo étnico estudiado, datos que en su mayoría provienen de estudios de poblaciones europeas, norteamericanas, asiáticas y africanas.<sup>6,10</sup>

De esta forma, de manera general y en base a importantes estudios poblacionales que incluyeron diversidad de grupos étnicos y gran cantidad de individuos, se ha establecido aproximadamente la frecuencia de las mutaciones del gen *CYP2D6*, así por ejemplo, para un fenotipo metabolizador lento las siguientes frecuencias: en poblaciones europeas la frecuencia es de 3% a 11.7%, en asiáticas es 1.2% a 4.8%, en africanos es de 1.8 % a 19%, y en norteamericanas es de 5% a 10 %. <sup>15,16</sup>

En contraste, los estudios en poblaciones sudamericanas, son escasos, incluyen poca diversidad de grupos étnicos, y pobre cantidad de individuos, así por ejemplo, y a partir de estudios en poblaciones en Brasil, Chile, Uruguay, Colombia, Venezuela, Argentina y Paraguay, la prevalencia aproximada del genotipo *CYP2D6* metabolizador lento está entre un 2.2% a 6.6%. <sup>15,16</sup>

Se resalta la inexistencia de reportes que delimiten alguna frecuencia de mutaciones del gen *CYP2D6* en el Perú y de su aplicación en la praxis médica; sin embargo, existen investigaciones previas en las que se ha logrado estandarizar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la amplificación de los 9 exones del gen *CYP2D6* <sup>17</sup>, antecedente que permite plantear la búsqueda de las mutaciones del gen *CYP2D6* tras la aplicación de técnicas moleculares como por ejemplo el secuenciamiento genético.

Establecer la frecuencia de las mutaciones del gen *CYP2D6* en poblaciones peruanas, proyectaría la optimización del tratamiento farmacológico en pacientes peruanos, en la búsqueda de la máxima seguridad y eficacia. En esta perspectiva, y

en el contexto de la salud pública, este estudio estableció la frecuencia de mutaciones en el exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos.



## **II.- MATERIAL Y METODOS**

### **2.1. Diseño Metodológico y tipo de investigación.**

Estudio descriptivo, transversal y no-experimental realizado entre Julio y Diciembre de 2013 en el Centro de Medicina Tradicional y Farmacología (CIMTFAR) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Las muestras poblacionales procedieron del Banco Genómico del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Estas correspondieron a individuos peruanos de las regiones de Andoas-Loreto, Chachapoyas-Amazonas, Abancay-Apurímac, Uros-Puno, San José-Lambayeque, y Lima-Lima, todos con acreditación voluntaria de su participación, por medio de un consentimiento informado, y con por lo menos tres generaciones en el lugar de origen.

La estrategia de selección de la muestra se realizó por muestreo de tipo no probabilístico o por conveniencia. Se consideró muestras que representen el norte, centro y sur, como la costa, sierra y selva del Perú.

El tamaño de la muestra fue de cuarenta y seis (n=46). La distribución por procedencia fue la siguiente: Andoas-Loreto (n=5), Chachapoyas-Amazonas (n=11), Abancay-Apurímac (n=6), Uros-Puno (n=8), San José-Lambayeque (n=7), y Lima-Lima (n=9).

### **2.2. Recolección de muestras biológicas y extracción de ADN.**

Se recolectó una muestra de 5 ml de sangre por punción venosa, ésta se almacenó en tubos con anticoagulante EDTA.

Alternativamente, se obtuvo muestras de células bucales, utilizando hisopos microbiológicos, esto consistió en el frotamiento de la cavidad bucal con hisopo por 1 minuto, luego se almacenó los hisopos en un recipiente con contenido de buffer lisis.

Ambos tipos de muestras fueron conservados en refrigeración hasta su traslado a la FMH-USMP, donde se realizó la extracción de ADN y tipificación molecular.

La extracción de ADN de linfocitos y/o células bucales, se efectuó por una técnica simplificada descrita por Salazar-Granara Alberto, que consistió en lo siguiente:

a) Lavado de células con Tris-EDTA. b) Lisado con N-Laurylsarcosine. c) Digestión proteica con Proteinasa K. d) Precipitación, y extracción con alcohol y sales, para la obtención del ADN. e) Seguidamente, el ADN se colocó en TE 10X buffer, y almacenó en refrigeradora a -4°C. f) Para el control de calidad del DNA extraído, se vertió 10ul del DNA por cada individuo en geles de agarosa al 1%, y se llevó a cabo una electroforesis en buffer TBE1X a 100V por 1 hora. g) Luego, el gel de agarosa es suspendido en bromuro de etidio por un periodo de 40 minutos, con fines de tinción del DNA. h) Finalmente, se sometió el gel de agarosa a radiación UV, para observar el DNA y comprobar que éste se encontraba en buen estado o degradado; las muestras de DNA degradadas fueron reemplazadas por muestras de ADN en estado óptimo, siguiendo el mismo procedimiento de validación.

### **2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 7 del gen *CYP2D6*.**

La amplificación específica del exón 7 del gen *CYP2D6*, se hizo por reacción en cadena de la polimerasa, se utilizaron los primer (cebadores) creados con herramientas bioinformáticas mediante comparación de las secuencias génicas completas del gen *CYP2D6* en humanos y las secuencias de ADN genómico de mamíferos, estos fueron: para CYP-F, 5' - TGA CAG GTG CAG AAT TGG AGG TC-3' y el primer CYP-R, 5' –TGA GGA GGA TGA TCC CAA CGAG - 3'.

Se preparó una mezcla (master mix) con un volumen de reacción final de 10  $\mu$ l, con 1  $\mu$ L de 10X buffer PCR (Fermentas), 0.4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0.1  $\mu$ L de Taq Polimerasa (Fermentas), 0,25  $\mu$ L de cada dNTPs (dinucleótidostrifosfato) y 0,2  $\mu$ L de cada primer.

Luego se amplificó el exón 7 del gen *CYP2D6* en un termociclador, empleando el programa denominado X1X9, que consistió en un paso inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, luego, un paso de hibridación a 55 °c por 45 segundos, y un paso de extensión a 72°C por 2 minutos, culminando en una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100v, en buffer TBE 1X durante 20 minutos. Posteriormente, fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador UV.

### **2.4. Análisis de secuenciamiento genético del gen *CYP2D6*.**

Los productos del PCR del exón 7 del gen *CYP2D6*, fueron enviados a Estados Unidos a la Empresa MacroGenCorp, para servicio de purificación del PCR y

secuenciamiento genético. Los resultados del secuenciamiento genético fueron enviados vía virtual, y el análisis de las secuencias genéticas fue realizado en la FMH-USMP.

La lectura y análisis de las secuencias genéticas del exón 7 del gen *CYP2D6*, se realizó empleando el Software de acceso libre en Internet BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), la secuencia examinada por cada individuo que ingresó al estudio, fue de 1475 pares de bases.

En un primer momento, se realizó una lectura manual de todas las secuencias genéticas, en la que se señalamos la ubicación donde se encontraba una mutación, y se copiamos la secuencia específica para un posterior alineamiento de la misma.

En un segundo momento, las secuencias del exón 7 del gen *CYP2D6* fueron ingresadas al Software BioEdit, y contrastadas con la secuencia normal o salvaje del gen *CYP2D6*, de acceso libre en Internet en el portal del GenomeDatabase NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1565>).

Ingresadas las secuencias en mención, se aplicó la función ClustaWMultipleAlignment, de esta forma las secuencias fueron alineadas o apareadas según la posición de sus bases nucleotídicas.

Posterior a ello, se procedió a aplicar la función Back-coloredviewmode, con ello automáticamente se delimita las bases o posiciones nucleotídicas donde existen polimorfismos de cambio de una base (SNP).

Obtenido esto, se procedió a corroborar las mismas con los datos de la lectura manual, previamente realizada a fin de cruzar información, y evitar pérdida de información que el Software, por sus características, no pudiera develar.

Los polimorfismos que se fueron confirmando, fueron ingresados a una base de datos en Excel, delimitando la posición del nucleótido afectado, y categorizándolos individualmente, y por combinaciones en alelos, haplotipos y genotipos, según se indica en el portal del National Center for Biotechnology Information, de acceso libre en Internet. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1565>).

Para el análisis individual de los polimorfismos según nucleótido afectado, se categorizó de la siguiente forma: alelo wt o salvaje, alelo mt o mutante, genotipo wt/wt o homocigoto salvaje, genotipo wt/mt o heterocigoto mutante, y mt/mt o homocigoto mutante.

Para el análisis integral de las combinaciones de los polimorfismos, en base a nucleótidos afectados en el exón 7 del gen *CYP2D6*, se empleó la base de datos del citocromo P450 humano (CYP), establecida por el comité para la nomenclatura de alelos de acceso libre en Internet ([www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)), así, se categorizó de la siguiente forma: haplotipo salvaje, haplotipo mutado, haplotipo metabolizador rápido, haplotipo metabolizador lento, genotipo homocigoto wt/wt, genotipo heterocigoto wt/mt, y genotipo homocigoto mt/mt.

Los haplotipos y genotipos conocidos, pero sin fenotipo definido, se denominaron “Desconocido”. Los haplotipos y genotipos nuevos, ergo sin fenotipo tipificado, se denominaron “Nuevo”, acompañado de una letra mayúscula, según el orden alfa numérico.



## 2.5. Análisis de los datos.

Los datos fueron recolectados prospectivamente, e ingresados a doble digitación en una base de datos simple. Asimismo, se organizaron de forma tabular y se muestran en tablas y gráficos de frecuencias simples y cruzadas, se empleó en este proceso el software estadístico SPSS versión 16.0.

Debido a la naturaleza de las variables de tipo cualitativa (datos nominales), para el análisis de significancia estadística de las tablas de frecuencia cruzadas, se realizó la prueba estadística del *Chi cuadrado* y de Fisher, éstas consideraron un valor  $p < 0.05$  para un intervalo de confianza del 95% como significativo.

Adicionalmente, se aplicó el test de equilibrio alélico de Hardy-Weinberg, para lo cual se utilizó el software de uso libre Arlequín (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) y Stata 5.0. (<http://krunch.med.yale.edu/hwsim/hwsim.exe>).

### III.- RESULTADOS

Se evaluó el polimorfismo del exón 7 del gen CYP2D6 en 46 pobladores peruanos, obteniéndose los siguientes resultados reportados en tablas y figuras.

**TABLA 1:** Frecuencia global de alelos y genotipos de los polimorfismos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos según la posiciones nucleotidas.

Cambio de bases nucleotidicas	NCBI dbRS Identifiers	Cambio de AA.	Efecto sobre la proteína	Posición genómica	Alelos*				Genotipos**						Alelos	Genotipos
					wt		mt		wt/wt		wt/mt		mt/mt			
					n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
A/G	rs199980688	ATC⇒ ATT	Isoleucina ⇒ Isoleucina	42523617	91	0.99	1	0.01	45	0.98	1	0.02	0	0	92	46
G/T	rs141824015	ATA ⇒ CTA	Isoleucina ⇒ Leucina	42523607	91	0.99	1	0.01	45	0.98	1	0.02	0	0	92	46
A/G	rs72549347	CGA ⇒ TGA	Arginina ⇒ Ter	42523592	86	0.93	6	0.07	40	0.87	6	0.13	0	0	92	46
C/G	rs267608295	CCA⇒CGA	Prolina⇒ Arginina	42523588	90	0.97	2	0.03	44	0.96	2	0.04	0	0	92	46
C/T	rs267608293	ATC⇒GTC	Isoleucina ⇒ Isoleucina	42523517	90	0.97	2	0.03	44	0.96	2	0.04	0	0	92	46
C/T	rs61745683	GTC⇒ATC	Valina ⇒ Isoleucina	42523514	91	0.99	1	0.01	45	0.98	1	0.02	0	0	92	46
T/C	NUEVO 1	GAG⇒AAG	Ac. glutamico⇒ Lisina	42523623	88	0.95	4	0.05	42	0.91	4	0.09	0	0	92	46
G/C	NUEVO 2	GAG⇒ CAG	Ac. glutamico⇒ Glutamina	42523586	71	0.77	21	0.23	25	0.54	21	0.46	0	0	92	46
T/C	NUEVO 3	CAC⇒ CAA	Histidina ⇒ Glutamina	42523530	88	0.96	4	0.04	42	0.91	4	0.09	0	0	92	46

A=Adenina. T=Timina. G=Guanina. C=Citosina. wt=wildtype o alelo salvaje. mt=mutation o alelo mutado.

wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

\* $\chi^2$  de Pearson  $p < 0.05$ . \*\*Test de Hardy Weinberg  $p > 0.05$ .

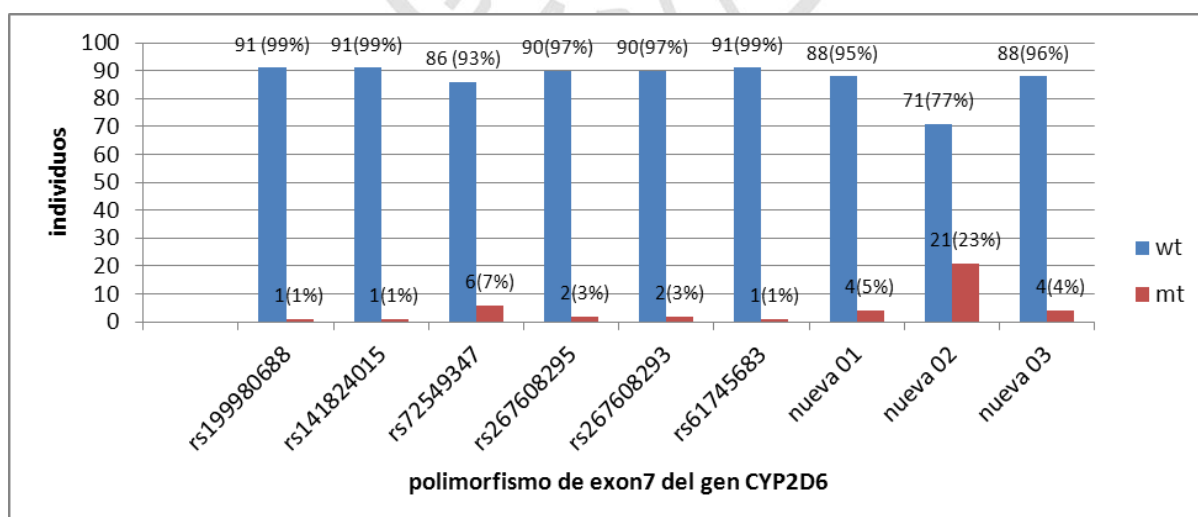
### 3.1 Análisis global de los alelos y genotipos de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos según la posiciones nucleotidas.

Como resultado hemos obtenido diversos SNP (Polimorfismos de un solo nucleótido) conocidos, estos fueron: rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293 y rs61745683. Asimismo, se descubrieron 3 nuevos SNP, estos los hemos calificados como Nuevo 1, Nuevo 2, y Nuevo 3. (Ver tabla 1).

### 3.2 Distribución global de los polimorfismos de exon7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos.-

Respecto a la distribución de los alelos o polimorfismos encontrados en la muestra evaluada (n=46), se detectaron 9 SNP (Polimorfismos de un solo nucleótido) rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293, rs61745683, nueva 01, nueva 02 y nueva 03, en la mayoría de los nucleótidos predominó el alelo salvaje o wild type además en la mayoría se apreció la alta frecuencia del alelo salvaje. ( $\chi^2$  de Pearson  $p < 0.05$ ). (Ver gráfico 1 y tabla 1)

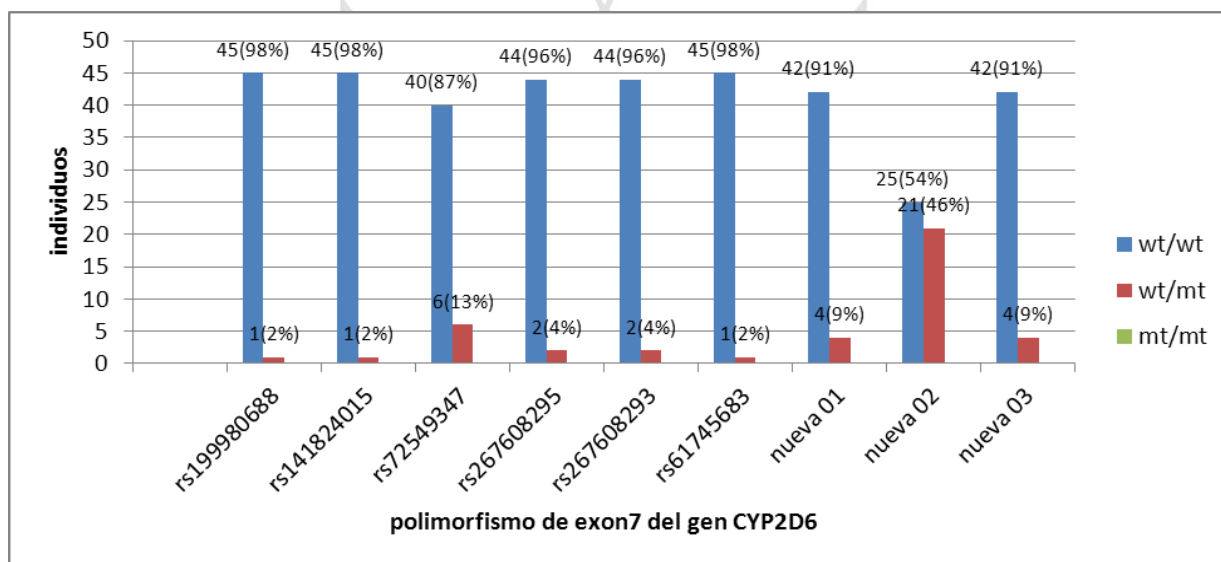
Gráfico n° 1: Frecuencia global de alelos de exón 7 de gen *cyp2d6* en pobladores peruanos



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutacion o alelo mutado

Respecto a la distribución de los genotipos encontrados, según los nucleótidos revelados, se puede apreciar sólo 2 tipos de genotipos, homocigotos salvajes (wt/wt) y heterocigoto (wt/mt), siendo ausente la presencia de homocigoto mutante (mt/mt). En su mayoría se pudo denotar el predominio de genotipo homocigoto salvaje (wt/wt), excepto en la mutación nueva 02 donde se vio una frecuencia similar entre homocigotos salvajes (wt/wt) y heterocigoto (wt/mt) (Hardy WeinbergTest  $p>0.05$ ). (Ver gráfico 2 y Tabla 1)

Gráfico n° 2: frecuencia global de genotipos de exón 7 del gen *cyp2d6* en pobladores peruanos



wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.3 Distribución global de haplotipos y genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos, según combinación de nucleótidos

En base al consenso internacional de haplotipos *CYP2D6*, la combinación de nucleótidos que se presentó en la muestra evaluada (n=46) generó un solo probable haplotipo conocido que es \*56. Asimismo, se descubrieron 5 nuevos haplotipos, a los que califico como: desconocido 1, desconocido 2, desconocido 3, desconocido 4 y desconocido 5. (Ver tabla 2).

Tabla nº 2: Frecuencia de haplotipos y genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos, según combinación de nucleótidos.

HAPLOTIPOS	COMBINACIONES	n	PROBABLE FENOTIPOS	ALELEOS				GENOTIPOS				Alelos	Genotipos		
				wt		mt		wt/wt		wt/mt				mt/mt	
				n	%	n	%	n	%	n	%			n	%
desconocido 1	(Nuevo 01) / Nuevo 02)	4	desconocido	4	0.04	4	0.04	0	0	4	0.09	0	0	92	46
desconocido 2	(Nuevo 02)	17	desconocido	17	0.18	17	0.18	0	0	17	0.37	0	0	92	46
desconocido 3	rs141824015 / rs267608295	1	desconocido	1	0.01	1	0.01	0	0	1	0.02	0	0	92	46
desconocido 4	rs199980688 / rs267608293	1	desconocido	1	0.01	1	0.01	0	0	1	0.02	0	0	92	46
desconocido 5	rs267608295 / rs267608293	1	desconocido	1	0.01	1	0.01	0	0	1	0.02	0	0	92	46
*56 a	rs72549347	1	lento	1	0.01	1	0.01	0	0	1	0.02	0	0	92	46
*56 b	rs72549347 / (Nuevo 02)	4	lento	4	0.04	4	0.04	0	0	4	0.09	0	0	92	46
*56 c	rs72549347 / rs61745683	1	lento	1	0.01	1	0.01	0	0	1	0.02	0	0	92	46

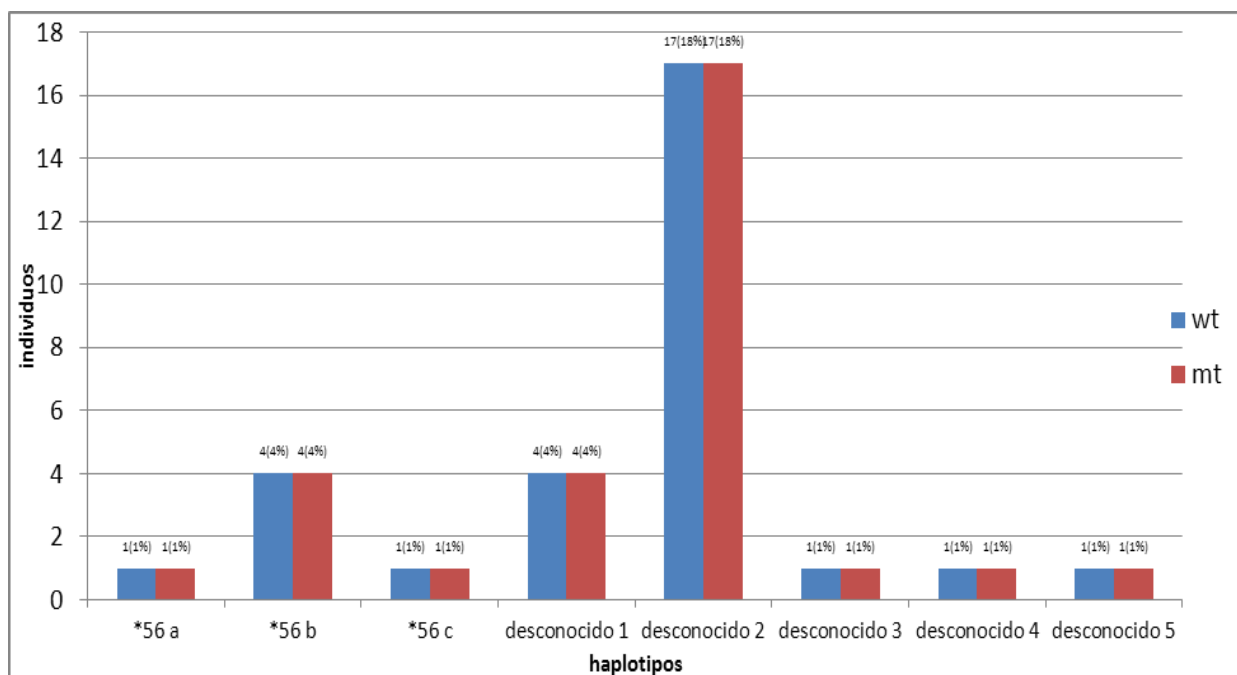
wt=wild type o alelo salvaje. mt=mtation o alelo mutado.

wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

\* $\chi^2$   $p > 0.05$  \*\*Test de Hardy Weinberg  $p > 0.05$ .

En la muestra (n=46), el haplotipo que predominó fue el haplotipo desconocido 2 representando el 18 % (n=17), seguido de los \*56 b y haplotipo desconocido 1 que represento 4 % (n=4) cada uno respectivamente. (Ver gráfico 3 y tabla 2)

Grafico nº 3: frecuencia global de los haplotipos de exón 7 del gen CYP2D6 en pobladores peruanos

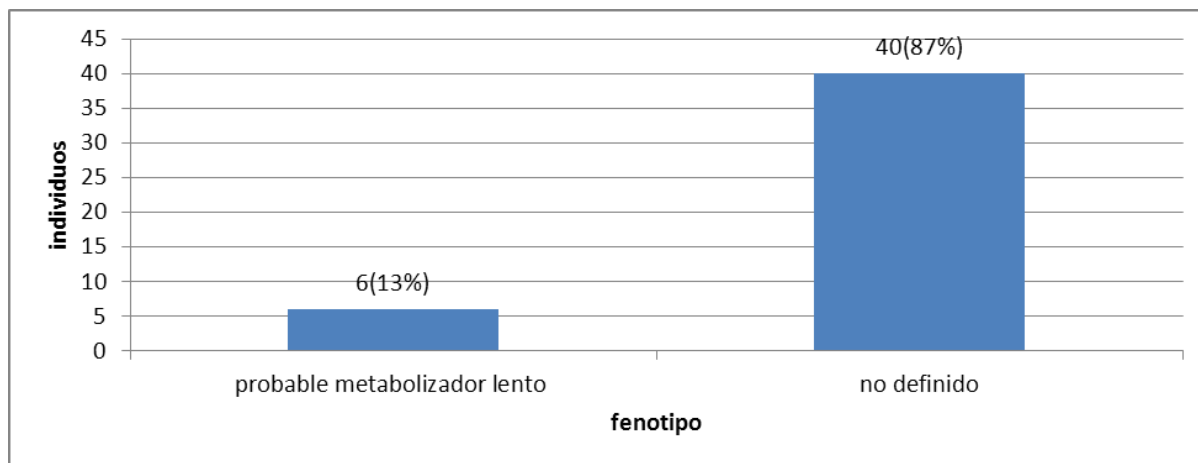


\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

### 3.4 Distribución de metabolizadores en pobladores peruanos según haplotipos del exón 7 del gen CYP2D6

En base a la combinación de haplotipos y generación de genotipos, se determinó la frecuencia del probable fenotipo metabolizador, en ese sentido sólo pudimos determinar la presencia de metabolizadores, que representaron el 13 % (n=6) y 87 % (n=40) sin fenotipo metabolizador definido. (Ver gráfico 4)

Grafico nº4: Frecuencia de los metabolizadores de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos



### 3.5 Análisis de los polimorfismos del exón 7 del gen *CYP2D6* por poblaciones peruanas.

En La distribución de alelos y genotipos en pobladores peruanos de las regiones de la costa (Lima (n=9) y San José-Lambayeque (n=7)), sierra (Apurímac (n=6) y Lago Titicaca-Puno (n=8)) y selva (Amazonas (n=11) y Andoas-Loreto (n=5)), hemos encontrado las 9 mutaciones anteriormente mencionados que son los rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293, rs61745683, Nuevo 01, Nuevo 02, y Nuevo 03, cuya distribución se reporta en la tabla 3.

Se determinó que la mayor frecuencia de SNPs fue encontrada en los pobladores de la amazonia, en contraste, con la región Lambayeque donde sólo se encontró 1 SNP (Polimorfismos de un solo nucleótido). (Ver tabla 3)

**Tabla 3. Frecuencias comparativas de los alelos y genotipos de exón 7 del gen *cyp2d6*, entre pobladores peruanos de las regiones de la costa (Lima y San Jose-Lambayeque), sierra (Apurímac y Lago Titicaca-Puno) y selva (Lamas-San Martín, Amazonas y Andoas-Loreto)**

departamento	n	mutacion (Rs)	Alelos						Genotipos									alelos	genotipo
			wt			mt			wt/wt			wt/mt			mt/mt				
			n	% intra	% inter	n	% intra	% inter	n	% intra	% inter	n	% intra	% inter	n	% intra	% inter		
Amazona	1	rs199980688	21	0.9545	0.2283	1	0.0455	0.0005	10	0.9091	0.0198	1	0.0909	0.0217	0	0	0	22	11
	1	rs141824015	21	0.9545	0.2283	1	0.0455	0.0005	10	0.9091	0.0198	1	0.0909	0.0217	0	0	0	22	11
	1	rs72549347	21	0.9545	0.2283	1	0.0455	0.0005	10	0.9091	0.0198	1	0.0909	0.0217	0	0	0	22	11
	2	rs267608295	20	0.9091	0.2174	2	0.0909	0.001	9	0.8182	0.0178	2	0.1818	0.0435	0	0	0	22	11
	3	nuevo 02	19	0.8636	0.2065	3	0.1364	0.0015	8	0.7273	0.0158	3	0.2727	0.0652	0	0	0	22	11
	2	rs267608293	20	0.9091	0.2174	2	0.0909	0.001	9	0.8182	0.0178	2	0.1818	0.0435	0	0	0	22	11
Apurimac	1	rs72549347	11	0.9167	0.1196	1	0.0833	0.0009	5	0.8333	0.0181	1	0.1667	0.0217	0	0	0	12	6
	4	nuevo 02	8	0.6667	0.087	4	0.3333	0.0036	2	0.3333	0.0072	4	0.6667	0.087	0	0	0	12	6
Lambayeque	4	nuevo 02	10	0.7143	0.1087	4	0.2857	0.0031	3	0.4286	0.0093	4	0.5714	0.087	0	0	0	14	7
Lima	3	nuevo 01	15	0.8333	0.163	3	0.1667	0.0018	6	0.6667	0.0145	3	0.3333	0.0652	0	0	0	18	9
	4	nuevo 02	14	0.7778	0.1522	4	0.2222	0.0024	5	0.5556	0.0121	4	0.4444	0.087	0	0	0	18	9
	3	nuevo 03	15	0.8333	0.163	3	0.1667	0.0018	6	0.6667	0.0145	3	0.3333	0.0652	0	0	0	18	9
Loreto	1	nuevo 01	9	0.9	0.0978	1	0.1	0.0011	4	0.8	0.0174	1	0.2	0.0217	0	0	0	10	5
	2	rs72549347	8	0.8	0.087	2	0.2	0.0022	3	0.6	0.013	2	0.4	0.0435	0	0	0	10	5
	4	nuevo 02	6	0.6	0.0652	4	0.4	0.0043	1	0.2	0.0043	4	0.8	0.087	0	0	0	10	5
	1	nuevo 03	9	0.9	0.0978	1	0.1	0.0011	4	0.8	0.0174	1	0.2	0.0217	0	0	0	10	5
Puno	2	rs72549347	14	0.875	0.1522	2	0.125	0.0014	6	0.75	0.0163	2	0.25	0.0435	0	0	0	16	8
	2	nuevo 02	14	0.875	0.1522	2	0.125	0.0014	6	0.75	0.0163	2	0.25	0.0435	0	0	0	16	8
	1	rs61745683	15	0.9375	0.163	1	0.0625	0.0007	7	0.875	0.019	1	0.125	0.0217	0	0	0	16	8

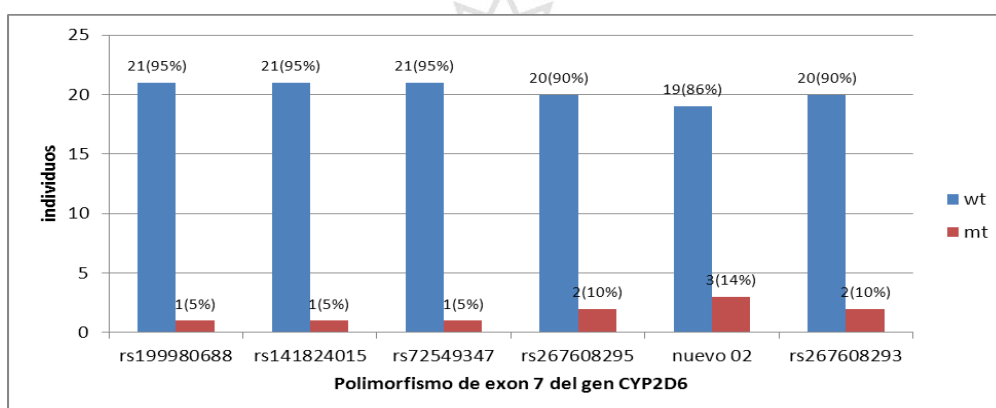
\*wt (wild type) = alelo salvaje, \*\*mt (mutant) = alelo mutante \*wt/wt = Genotipo homocigoto salvaje, \*\*wt/mt = Genotipo heterocigoto mutante y \*\*\*mt/mt = Genotipo homocigoto mutante, <sup>a</sup>Al comparar las frecuencias alelicas entre pares de poblaciones, se encontraron diferencias significativas (según prueba  $X^2$ ,  $p < 0.05$ ).+



### 3.6 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Amazonas.

Respecto la distribución de los alelos en el departamento de Amazona (n=11) se encontró 6 tipos de SNP, en su mayoría predominó el alelo salvaje o wild type. (Ver gráfico n° 5)

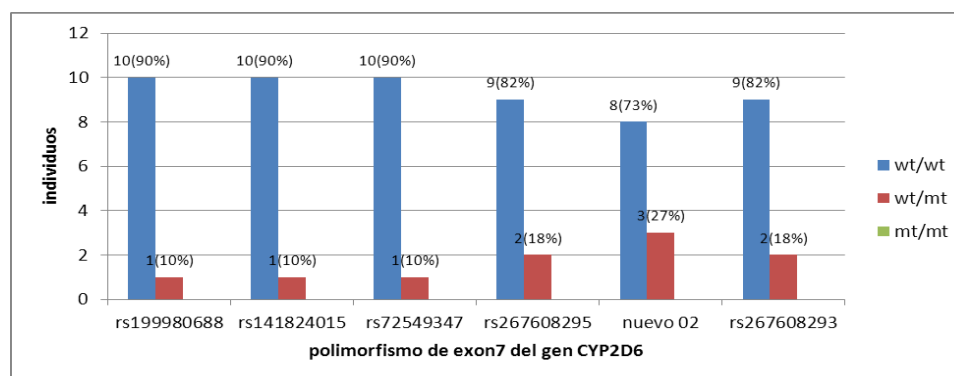
Gráfico n°5: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Amazona



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

En cuanto la distribución de los genotipos en los pobladores de Amazona se pudo apreciar el predominio de genotipo homocigoto salvaje (wt/wt) (ver gráfico n° 6)

Gráfico n°6: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Amazona

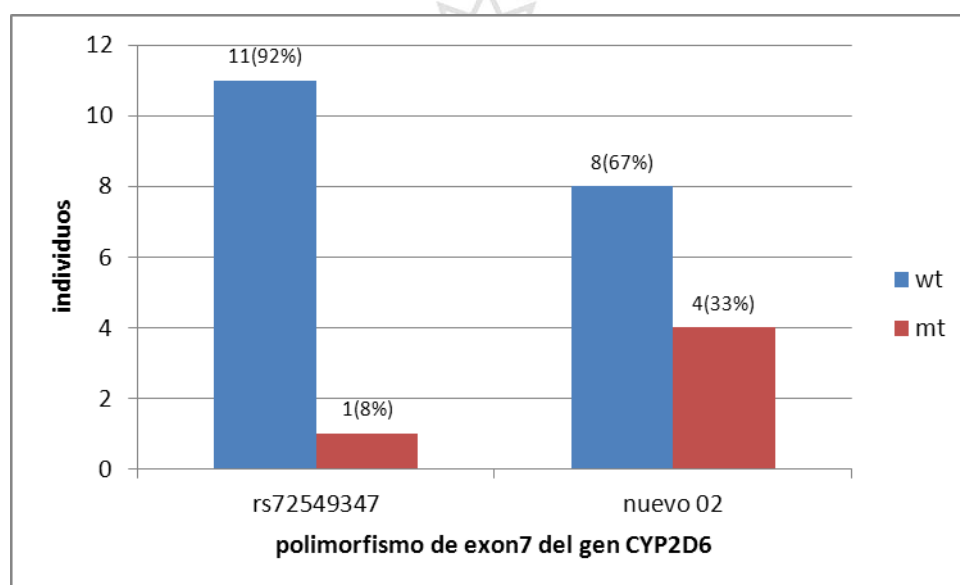


wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.7 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Apurímac.

En los pobladores de Apurímac quienes fueron 6 individuos pudimos encontrar 2 tipos de mutaciones que fueron rs72549347 y nuevo 02 donde su distribución de los alelos en su mayoría fue de predominio el alelo salvaje o wild type. (ver gráfico 7).

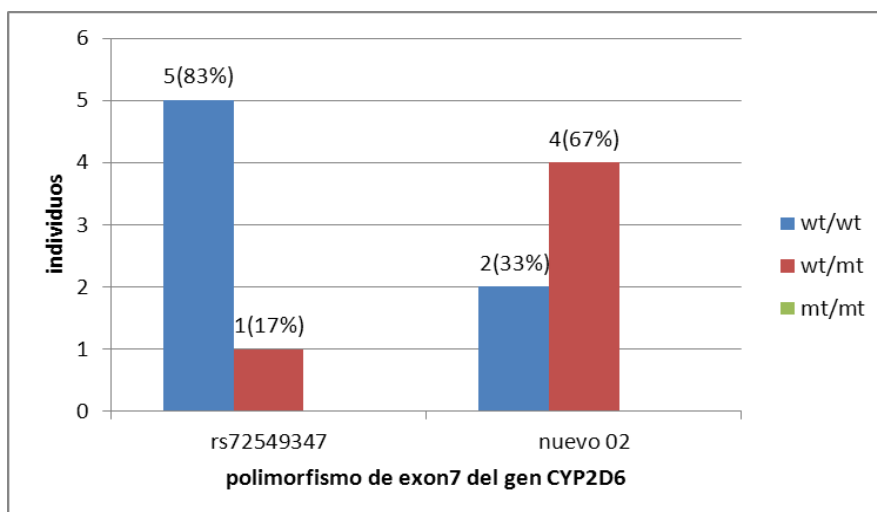
Grafico n°7: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Apurimac



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

La distribución de los genotipos en los pobladores de Apurímac se puede denotar que en el polimorfismo rs72549347 predominó el genotipo homocigoto salvaje (wt/wt) mientras que en el nuevo polimorfismo (nuevo 2) encontrado predominó el genotipo heterocigoto mutante (wt/mt) (ver gráfico 8).

Grafico n°8: Frecuencia de los genotipos del gen *CYP2D6* en pobladores de Apurímac

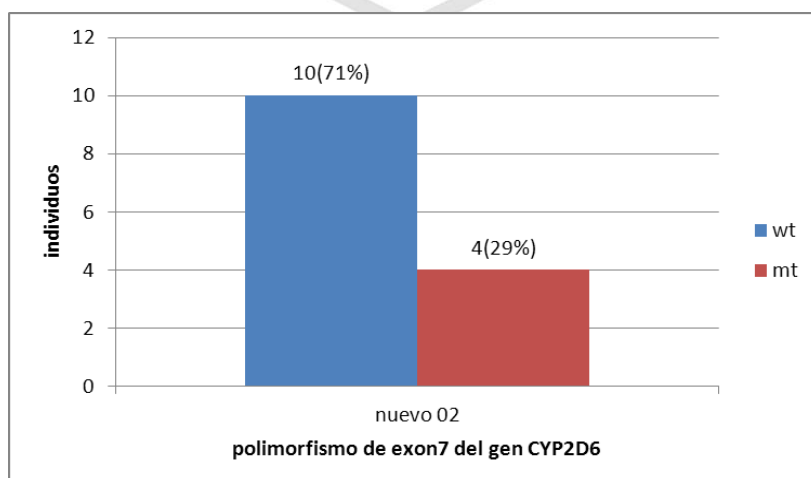


wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.8 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Lambayeque.

En los 7 pobladores de Lambayeque se puede observar un solo tipo de polimorfismo que es la nueva 02 donde su distribución alélica se denota su predominio de alelo salvaje o wild type (ver grafica 9)

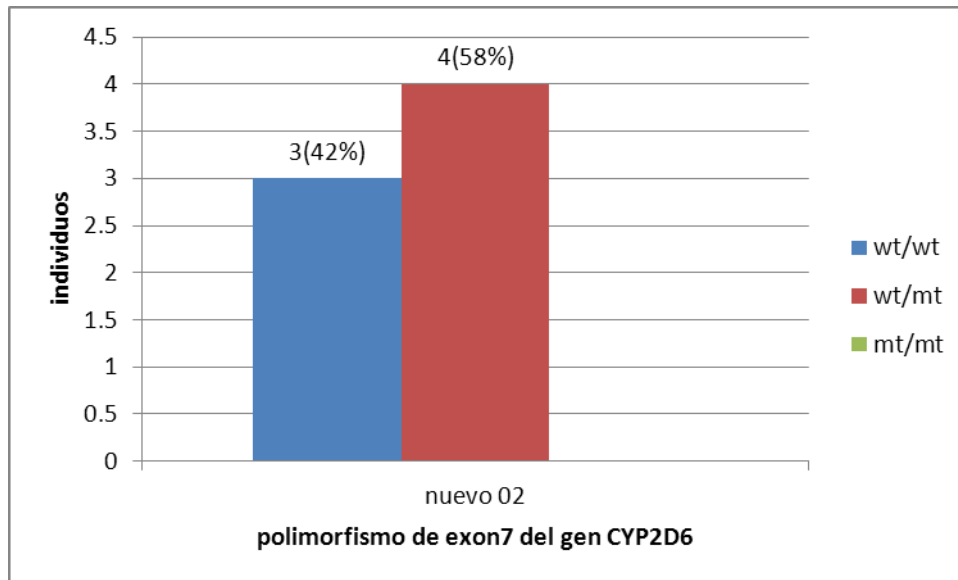
Grafico n°9: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Lambayeque



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

Respecto a su distribución genotípica se puede apreciar su superioridad de genotipo heterocigoto mutante (wt/mt). (ver grafica 10)

Grafico nº10: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Lambayeque

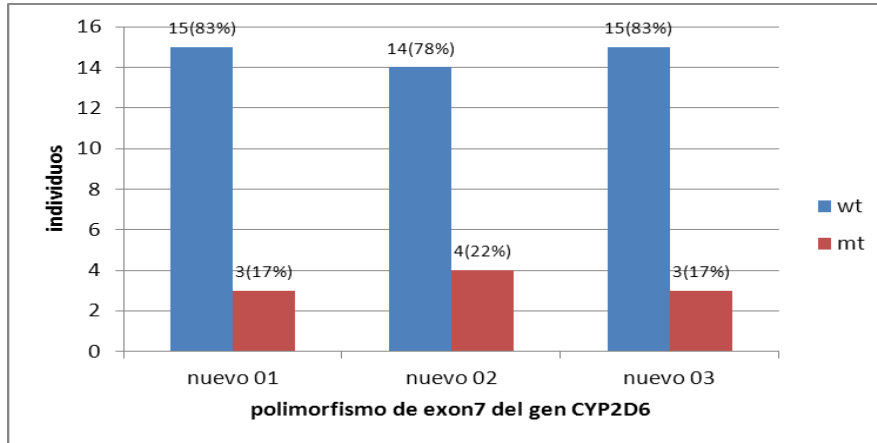


wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.9 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Lima.

En los 9 individuos de departamento de Lima se pudo observar que los SNP encontrados en esta región fueron los nuevos polimorfismos encontrados durante la investigación que son los nuevo 1, nuevo 2 y nuevo 3. Su distribución de los alelos se observa que predomina el alelo salvaje o wild type y también se puede describir la alta frecuencia del alelo salvaje. (Ver grafica 11)

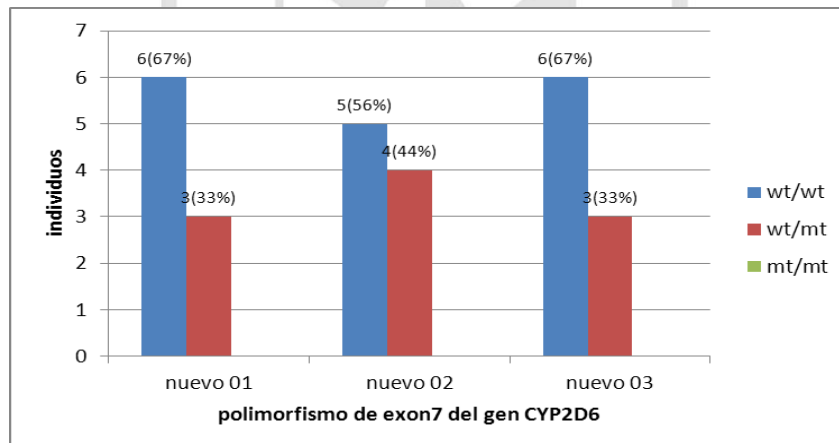
Grafico nº11: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Lima



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

En cuanto a la distribución genotípica se aprecia que predomina el genotipo homocigoto salvaje (wt/wt). (Ver grafica 12)

Grafico nº12: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de lima



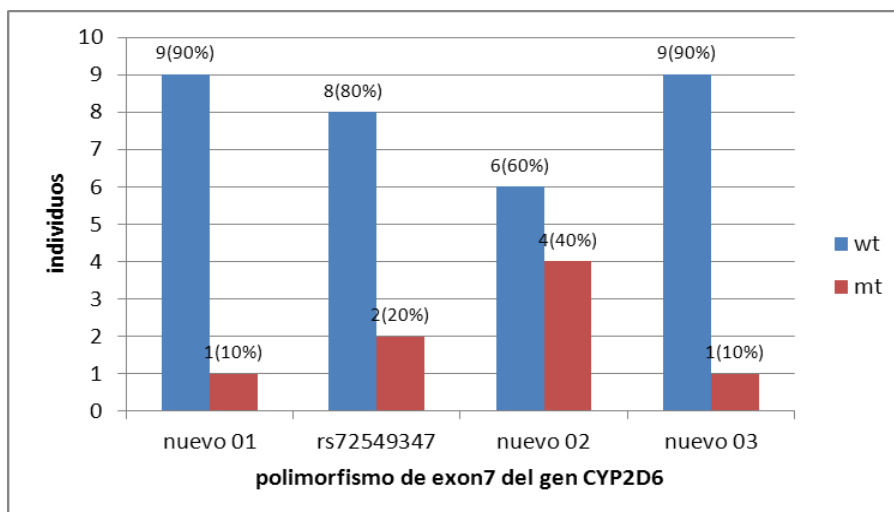
wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.10 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Loreto.

En los 5 pobladores de Loreto se han encontrado 4 tipos de SNP donde en su mayoría fueron los nuevos polimorfismos encontrados durante la investigación

En la distribución alélica de estos pobladores se puede observar que en su mayoría se puede denotar el predominio de alelo salvaje o wild type. (Ver gráfico 13).

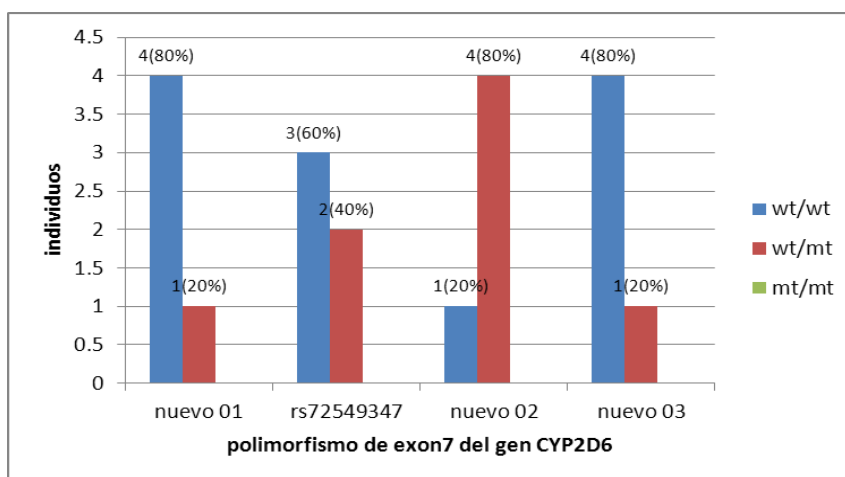
Grafico; nº13 Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Loreto



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

Respecto a la distribución de los genotipos encontrados, según los nucleótidos revelados se encuentran que predomina el genotipo homocigoto salvaje (wt/wt) excepto para el polimorfismo nuevo 2 en que predominó el genotipo wt/mt. (Ver gráfico 14)

Grafico nº14: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Loreto

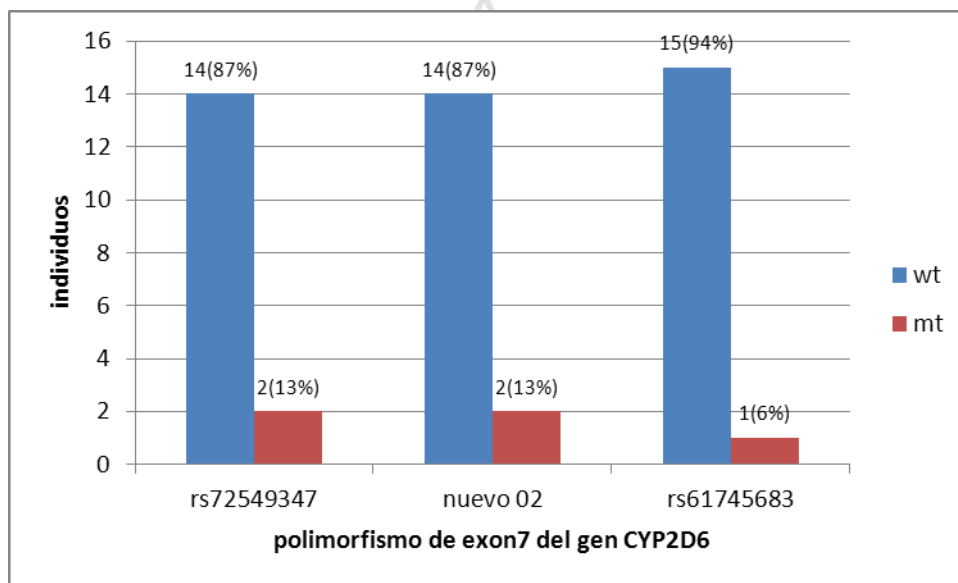


wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.11 Análisis de los polimorfismos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Puno.

En los 8 pobladores de Puno pudimos denotar que en su mayoría predomina el alelo salvaje o wild type y en alto porcentajes. (Ver gráfico 15)

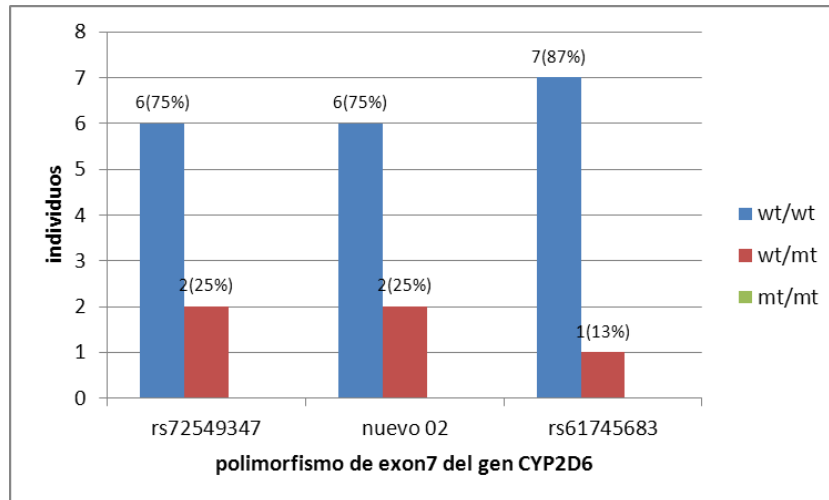
Gráfico n°15: Frecuencia de los alelos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Puno



\*wt=wildtype o alelo salvaje. \*\*mt=mutation o alelo mutado

Mientras que en su distribución genotípica se puede observar el predominio de genotipo homocigoto salvaje (wt/wt) entre los 3 polimorfismos encontrados. (Ver gráfico 16)

Gráfico n°16: Frecuencia de los genotipos de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores de Puno



wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

### 3.12 Distribución de haplotipos por poblaciones peruanas según análisis del exón 7 del gen *CYP2D6*

En base al consenso internacional de haplotipos de exón 7 del gen *CYP2D6*, la combinación de nucleótidos que se presentó en las 46 muestras evaluadas entre pobladores peruanos de las regiones de la costa (Lima y San Jose-Lambayeque), sierra (Apurímac y Lago Titicaca-Puno) y selva (Lamas-San Martin, Amazonas y Andoas-Loreto), se generó un solo probable haplotipo conocido que es\*56, donde se pudo observar solo en los pobladores de Puno, Loreto y Apurímac. (Ver tabla 4)

El haplotipo dominante en los diferentes departamentos fue el haplotipo desconocido 2. (Ver tabla 4)

El departamento con mayor cantidad de haplotipos encontrados fue Amazona mientras que el departamento de Lambayeque solo se pudo apreciar un solo haplotipo que fue el desconocido 2. (Ver tabla 4)



**Tabla 4. Frecuencia por pobladores de haplotipos y genotipos del gen *CYP2 D6* en pobladores peruanos, según combinación de nucleótidos**

Regiones	Haplotipos	combinación de nucleótidos	n	Fenotipos probables	alelos				genotipos						alelos	genotipos
					wt		mt		wt/wt		wt/mt		mt/mt			
					n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Amazona	desconocido 2	(Nueva 02)	2	desconocido	2	0.09	2	0.18	0	0	2	0.18	0	0	22	11
	desconocido 3	rs141824015 / rs267608295	1	desconocido	1	0.05	1	0.01	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	desconocido 4	rs199980688 / rs267608293	1	desconocido	1	0.05	1	0.01	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	desconocido 5	rs267608295 / rs267608293	1	desconocido	1	0.05	1	0.01	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	*56 b	rs72549347 / (Nueva 02)	1	lento	1	0.05	1	0.04	0	0	1	0.09	0	0	22	11
Apurimac	desconocido 2	(Nueva 02)	3	desconocido	3	0.25	3	0.25	0	0	3	0.5	0	0	12	6
	*56 b	rs72549347 / (Nueva 02)	1	lento	1	0.08	1	0.08	0	0	1	0.17	0	0	12	6
Lambayeque	desconocido 2	(Nueva 02)	4	desconocido	4	0.29	4	0.29	0	0	4	0.57	0	0	14	7
Lima	desconocido 1	(Nueva 01) / (Nueva 03)	3	desconocido	3	0.17	3	0.17	0	0	3	0.33	0	0	18	9
	desconocido 2	(Nueva 02)	4	desconocido	4	0.22	4	0.22	0	0	4	0.44	0	0	18	9
Loreto	desconocido 1	(Nueva 01) / (Nueva 03t)	1	desconocido	1	0.05	1	0.05	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	*56 b	rs72549347 / (Nueva 02)	2	lento	2	0.09	2	0.09	0	0	2	0.18	0	0	22	11
	desconocido 2	(Nueva 02)	2	desconocido	2	0.09	2	0.09	0	0	2	0.18	0	0	22	11
Puno	*56 c	rs72549347 / rs61745683	1	desconocido	1	0.05	1	0.05	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	*56 a	rs72549347	1	lento	1	0.05	1	0.05	0	0	1	0.09	0	0	22	11
	desconocido 2	(Nueva 02)	2	desconocido	2	0.09	2	0.09	0	0	2	0.18	0	0	22	11

wt=wild type o alelo salvaje. mt=mtation o alelo mutado, wt/wt=Genotipo homocigoto normal. wt/mt=Genotipo heterocigoto. mt/mt=Genotipo homocigoto mutante

\* $\chi^2$   $p > 0.05$  \*\*Test de Hardy Weinberg  $p > 0.05$ .

### **3.13 Distribución de metabolizadores por poblaciones peruanas según análisis del exón 7 del gen *CYP2D6***

En base a la combinación de haplotipos y generación de genotipos, se determinó la frecuencia del probable fenotipo metabolizador, en ese sentido sólo se observó la presencia de metabolizadores lentos.

En el departamento de Amazona, de una muestra de 11 pobladores observamos la presencia del metabolizadores lento en un 9 % (n=1), frente a 91 % (n=10) de los metabolizadores no definido. (Ver gráfico 17)

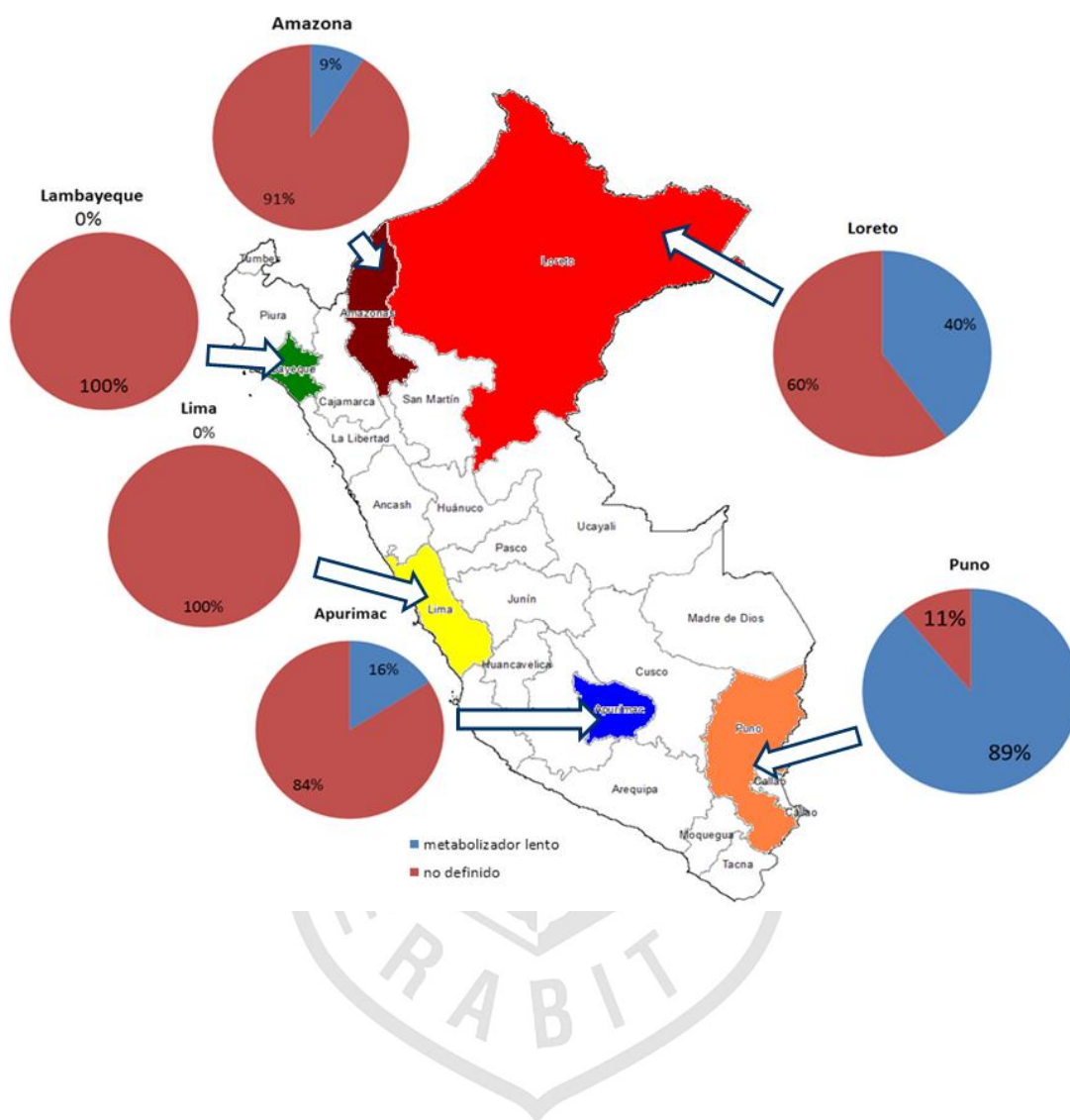
En el departamento de Apurimac de una muestra de 6 pobladores observamos la presencia del metabolizadores lento en un 16 % (n=1), frente a 84% (n=5) de los metabolizadores no definido. (Ver gráfico 17)

En el departamento de Loreto de una muestra de 5 pobladores observamos la presencia del metabolizadores lento en un 40 % (n=2), frente a 60 % (n=3) de los metabolizadores no definido. (Ver gráfico 17)

En el departamento de Puno de una muestra de 9 pobladores observamos la presencia del metabolizadores lento en un 89 % (n=8), frente a 11 % (n=1) de los metabolizadores no definido. (Ver gráfico 17)

Mientras que en los pobladores de Lambayeque y Lima que son de región costa no pudimos encontrar presencia de metabolizadores lento. (Ver gráfico 17)

Grafica n° 17 Frecuencias por pobladores de los metabolizadores de exón 7 del gen *CYP2D6* en pobladores peruanos



#### IV.- DISCUSION

El conocimiento de los diferentes alelos (variantes o mutaciones) del gen *CYP2D6* y los potenciales efectos en el fenotipo de esta enzima, son registrados y periódicamente actualizados por un comité internacional de especialistas, cuya información se encuentra de acceso libre en el sitio web <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>, en tal sentido, en este estudio se reportan 6 mutaciones (SNP) reconocidas por este comité de especialistas, situación que valida los resultados del estudio.<sup>18</sup>

Las mutaciones reconocidas en el exón 7 del gen *CYP2D6* en la investigación, fueron 9 polimorfismos de cambio de un nucleótido (SNP), 6 de estos correspondieron a mutaciones conocidas, estos fueron: rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293 y rs61745683. Asimismo, se descubrieron 3 nuevos SNP, estos los hemos calificados como Nuevo 1, Nuevo 2, y Nuevo 3 (Ver gráfico 2 y Tabla 1)

Contrastando los polimorfismos encontrados en este estudio, frente a poblaciones de otros orígenes y regiones del mundo, se ha determinado probables diferencias, así, comparando los resultados de SNP rs199980688 en pobladores peruanos, la frecuencia fue del 1 % (n=1), mientras que en el estudio realizado en pobladores de Italia, éste se presentó en 1 %, resultado similar a nuestro estudio.<sup>19</sup>

En cuanto al polimorfismo rs141824015 se presentó una frecuencia del 1 % de los pobladores peruanos, porcentaje similar al contrastar con pobladores de Estados Unidos, el cual presenta una frecuencia del 0.1 %.<sup>20</sup>

El polimorfismo rs61745683 se encontró en 1 % (n=1) de los pobladores peruanos, en contraste, en pobladores norteamericanos se presenta en un porcentaje de 17 %.<sup>21</sup>

Otro polimorfismo que reportamos en el exón 7 del gen CYP2D6 el rs72549347, no se han encontrado estudios poblacionales de las frecuencias de este SNP, sin embargo, este polimorfismo al parecer es de procedencia norteamericana, debido a que su descubrimiento fue hecho por la empresa Affymetrix Human Genome en el año 2008 <sup>22</sup>; una razón por la cual no se reportan estudios de frecuencias de este SNP, es quizás su poca prevalencia, sin embargo, para la muestra poblacional peruana, represento el 7 %, evidenciando la variabilidad entre las poblaciones de otros continentes.

Por otra parte, lo antes mencionado es de relevancia, debido que en la actualidad los test genéticos del gen *CYP2D6* incluyen este SNP rs72549347 como parte del diagnostico del genotipo metabolizador lento \*56.<sup>22</sup>

Respecto al polimorfismo rs267608295 y se presentó una frecuencia del 3 % de los pobladores peruanos lo cual es un porcentaje similar al comparar con pobladores de europeos, el cual presenta una frecuencia del 2.7%.<sup>23</sup>

El polimorfismo rs267608293 al igual que la mutación rs267608295 presento en 3 % de los pobladores peruanos donde podemos observar que es un porcentaje similar a los pobladores europeos pues en ellos el 2.7 % pobladores presentaba dicha mutacion.<sup>23</sup>

Otro aspecto importante revelado en este estudio, es el reporte de probables individuos metabolizadores lentos, que según el consenso internacional de haplotipos *CYP2D6*, en la población peruana explorada se presentó el haplotipo *CYP2D6\*56*, en una frecuencia del 6 %, y por otra parte el genotipo correspondiente se presentó en una frecuencia global del 13 %, en contraste a los estudios poblacionales, por ejemplo, el haplotipo *CYP2D6\*56* se encuentra en una frecuencia del 1 % en pobladores norteamericanos <sup>25</sup>,

Por otra parte, respecto al genotipo metabolizador lento, en la muestra de individuos peruanos, el porcentaje fue 13 %, frente a 3.2% en Finlandia al, 11.7% en Alemania, 8.9% en Inglaterra, 10% en Suiza, 7.9% en italianos, 4.7% en españoles, 0 % a 1.2 % en poblaciones asiáticas del este, 1.8% a 4.8% en poblaciones asiáticas del oeste, 1.8% a 8 % en poblaciones africanas, y en poblaciones hispanas fue 4.6% en Cuba, y 5.6% en Nicaragua.<sup>16</sup>

La evidente variabilidad que se describe en el párrafo anterior, nos revela un panorama de heterogeneidad de las mutaciones del gen *CYP2D6* entre las poblaciones, evento que debe ser considerado en la salud pública, considerando que el genotipo metabolizador lento influye en la respuesta a fármacos descritos en párrafos previos, como el Tamoxifeno, la codeína entre otros, pero también es probable su influencia en la fisiopatología de enfermedades como Cáncer de Pulmon, Cáncer de Hígado, Diabetes mellitus, hipertensión arterial, entre otros.<sup>26-28</sup>

Es de resaltar, que en este estudio, adicionalmente se reveló la presencia de 5 nuevos haplotipos, calificados como desconocido 1, desconocido 2, desconocido 3,

deconocido 4 y desconocido 5, situación que propone para estudios futuros, definir el tipo de metabolizador que expresara estos haplotipos. (Ver tabla 2).

Es importante considerar que el genotipaje de las mutaciones del gen CYP2D6, es ofertado por diversas empresas en el mundo, las que consideran en sus análisis diagnósticos, mutaciones conocidas y altamente prevalentes en poblaciones norteamericanas, europeas, asiáticas y africanas, lo cual, en un panorama en el que un individuo o paciente peruano, accede a estas pruebas diagnósticas, existirá una probabilidad de diagnósticos de metabolizadores falsos positivos, esta condición promueve recomendar mayores estudios en poblaciones peruanas, y generación de pruebas diagnósticas acordes su realidad, los que podrían iniciarse, en base a las frecuencias de mutaciones del exón 7 del gen CYP2D6 exploradas en este estudio.

Aun siendo el primer reporte de mutaciones del gen CYP2D6 en poblaciones peruanas, es preciso resaltar como principales limitaciones de este estudio la muestra poblacional pequeña, la cual no permite extrapolar los resultados a todos los peruanos, y por otra parte, el hecho de que aun existen por explorar 8 regiones exónicas funcionales del gen CYP2D6, lo cual promoverá continuar con esta línea de investigación en el Perú.

## V.- CONCLUSIONES

Se encontró la presencia de los siguientes polimorfismos: rs199980688, rs141824015, rs72549347, rs267608295, rs267608293 y rs61745683 y se descubrieron 3 nuevos polimorfismo donde hemos calificados como Nuevo 1, Nuevo 2, y Nuevo 3

Se reporta un solo probable haplotipo conocido que es \*56. Asimismo, se descubrieron 5 nuevos haplotipos lo cual fueron nombrados como deconocido 1, deconocido 2, deconocido 3, deconocido 4 y desconocido 5.

Se presenta una frecuencia de individuos con genotipo metabolizador lento que represento el 13 %, asimismo, se resalta la presencia de un 87 % de individuos sin fenotipo metabolizador definido.

Se detectó la presencia de alelos y genotipos metabolizadores lentos en pobladores peruanos de Andoas-Loreto, Chachapoyas-Amazonas, Abancay-Apurímac, Uros-Puno, San José-Lambayeque, y Lima-Lima.

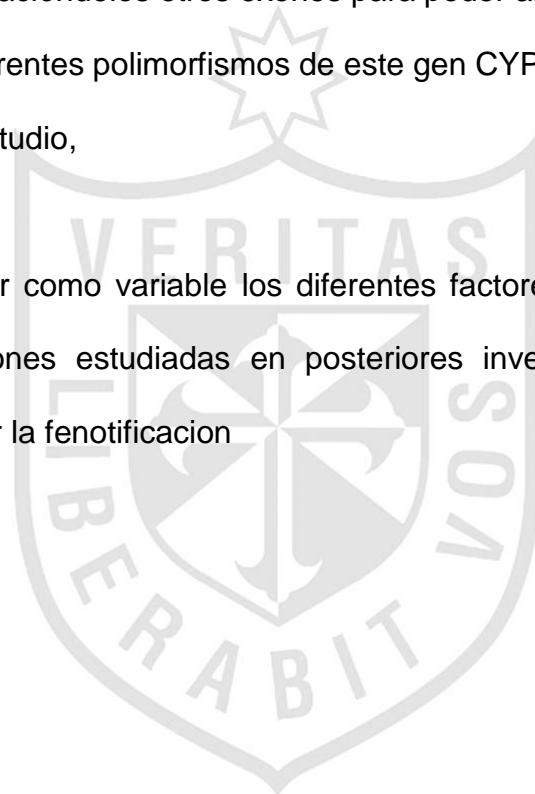


## VI.- RECOMENDACIONES

-Ampliar las muestras poblacionales, e incluir aún más regiones del Perú, a fin de conocer con mayor precisión el carácter genético *CYP2D6* como de otros genes de implicancia clínica

-Realizar la genotipificación de los otros exones para poder ampliar el base de dato y conocer mejor las diferentes polimorfismos de este gen *CYP2D6* que no pudimos conocer en nuestro estudio,

-Se recomienda incluir como variable los diferentes factores exógenos que puede influir en las mutaciones estudiadas en posteriores investigaciones pues estos factores podrían variar la fenotificación



## VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Koo SH, Lee EJD. Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006; 33(5-6):525-32.
2. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*. 2006; 6(1):16-21.
3. Kalow W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope of personalized medicine. *Pharmacogenomics J*. 2006; 6(3):162-5.
4. Orellana M, Guajardo V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Méd. Chile* 2004; 132: 85-94.
5. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54(10):1271-94.
6. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P-450: a success story. *Genome Biol*. 2000;1(6):3003.1-9.
7. Llerena A., Cobaleda J., Martinez C., Benitez J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1996; 21(2):129-38.
8. Dahl ML. Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing?. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41(7):453-70.

9. Joseph D. Ma, PharmD1, Kelly C. Lee, PharmD, BCPP1, and Grace M. Kuo, PharmD, MPH, PhD1. Clinical Application of Pharmacogenomics *Journal of Pharmacy Practice*, 2012; 25(4):417-427.
10. Sachse C, Brockmoller J, Baue S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(2):284-95.
11. JK Hicks, JJ Swen, CF Thorn, K Sangkuhl, ED Kharasch, VL Ellingrod, TC Skaar, DJ Muller, A Gaedigk and JC Stingl. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 2013; 6(3):162-5.
12. Newman WG, Hadfield KD, Latif A et al. Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(18):5913-8.
13. Bertilsson, L., Dahl, M., Dalén, P., & Al-Shurbaji, A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Clin Pharmacol* 2002; 10(9), 111-122.
14. Gordillo, E. P. Los Polimorfismos genéticos del Citocromo P450y su relevancia en el metabolismo de xenobióticos. *Infármate*.2008;4(3):2-16.
15. Bernard, S., Neville, K.A., Nguyen A.T., Flockhartb, D.A. Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. *The Oncologist* 2006; 11(6) 126-135.

16. Llerena, A., Dorado, P., & Peñas Lledó, E. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Future Medicine* 2009; 10(4), 1-12.
17. Escalante L., Gil D., Gómez M., Gutiérrez W., Moya R. Implementación de un protocolo para la búsqueda de mutaciones y genotipaje del gen CYP2D6 en pobladores peruanos. Proyecto de Investigación del Curso de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (2008)
18. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>. Actualizado 23-Mar-2009 (Accesado el 20 de enero 2014)
19. Matteo Falzoi, Luigi Pira, Paolo Lazzari, Luca Pani. Genotyping of CYP2D6 Polymorphisms by MALDI-TOF Mass Spectrometry in Sardinian People. *ISRN Genetics*. 2013; 13(10): 8
20. Home Page of the National Center for Biotechnology Information. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=61745683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=61745683). actualizado 23-Mar-2013 (Accesado el 02 de enero 2014)
21. Home Page of the National Center for Biotechnology Information. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=61745683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=61745683). Actualizado 23-Mar-2013 (Accesado el 02 de enero 2014)

22. Home Page of the National Center for Biotechnology Information.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=72549347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=72549347).  
Actualizado 23-Mar-2013 (Accesado el 02 de enero 2014)
23. Gaedigk A, Eklund JD, Pearce RE, Leeder JS, Alander SW, Phillips MS, Bradford LD, Kennedy MJ. Identification and characterization of CYP2D6\*56B, an allele associated with the poor metabolizer phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2007; 81(6):817-20
24. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo 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. 1997; 7(3):193-202.
25. Li Li, Run-Mei Pan, Todd D. Porter, Neil S. Jensen, Paul Silber, Guy Russo, John A. Tine, John Heim, Barbara Ring, and Peter J. Wedlund. new cytochrome p450 2d6\*56 allele identified by genotype/phenotype analysis of cryopreserved human hepatocytes. *drug metabolism and disposition.* 2006; 34(8):1411–1416.
26. London SJ, Daly AK, Leathart JB Genetic polymorphism CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians Los Angeles County. *Carcinogenesis* 1997; 18(7):1203–1214
27. McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE, Henner WD. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 5(2): 589-594.

28. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer*.2004; 110(7): 598-604.

