

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

*Análisis de los polimorfismos *4 y *10 del gen CYP2D6, S y L del promotor del gen SLC6A4 en pacientes con esquizofrenia y su correlación con la respuesta farmacológica a los antipsicóticos.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q. F. B. JORGE GUILLÉN ALFARO

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Humberto Nicolini Sánchez

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTOR

Dr. Mauricio Castañon Arreola

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORA

M. en C. Beatriz E. Camarena Medellín

Laboratorio de Genética Psiquiátrica

Instituto Nacional de Psiquiatria "Juan Ramón de la Fuente".

ASESORA

M. en C. Mávil López Casamichana

Asesor Académico Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORA

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias al apoyo académico y económico que otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México. El trabajo se realizó tanto en el laboratorio No. 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México con la tutoría del Dr. Humberto Nicolini Sánchez, el Dr. Mauricio Castañón Arreola, la M. en C. Mavil López Casamichana y la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez, y en el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría "Juan Ramón de la Fuente" con el valioso apoyo y asesoría de la M. en C. Beatriz E. Camarena Medellín y el M. en C. Alejandro Aguilar García. Asimismo, hago extensivos los agradecimientos a todos aquellos profesores del posgrado que participaron en mi formación, así como a la Dra. Marisol López López del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana y el M. en C. Jorge Guerrero del laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia.

De la misma forma quiero agradecer a amigos y compañeros de la UACM, Fátima Catalina Sánchez Domínguez, María de Lourdes Rodríguez Murguía, Alma Delia Genis Mendoza, Maria Guadalupe Salas Martínez, Julián Ramírez Bello, Olga Nohemí Hernández de la Cruz, Itzel Lopez Rosas y Erick Meneses Hidalgo.

Mi agradecimiento y cariño a mis mejores amigos Edna Edith Lujan Belmontes, Elena Sofía Abarca Ávila, María Eugenia Ambríz Franco Romero, Rayo Orea Ochoa, Lidia López Sánchez y Mauro López Armenta.

Doy también gracias a quienes me han acompañado en cada instante y de los que sólo recibo cariño y aliento, mi familia. A mi hermana Monica Guillén Alfaro, pero sobre todo a mis padres, Jorge Guillén Campos y Concepción Alfaro Rodríguez, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado en cada proyecto que emprendo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.	I
LISTA DE FIGURAS.	II
LISTA DE TABLAS.	III
LISTO DE GRÁFICOS.	IV
RESUMEN.	VI
INTRODUCCIÓN	
1. La Esquizofrenia.	1
1.1 Consecuencias de la esquizofrenia.	2
1.2 Diagnóstico.	2
1.3 Epidemiología.	4
1.3.1 Incidencia y prevalencia.	4
1.3.2 Mortalidad y comorbilidad.	4
1.4 Manifestaciones clínicas.	5
1.5 Síntomas de la esquizofrenia.	6
1.5.1 Síntomas positivos:	6
1.5.2 Síntomas negativos:	6
1.6 Clasificación de la esquizofrenia.	7
2. Evolución y pronóstico.	7
3. Etiología de la esquizofrenia.	9
3.1 Factores de riesgo genético.	9
3.2 Factores de riesgo ambientales.	10
3.3 Hipótesis moleculares de la esquizofrenia.	11
3.3.1 Hipótesis dopaminérgica.	11
3.3.2 Hipótesis glutaminérgica.	12
3.3.3 Hipótesis serotoninérgica.	13
4. Genética y farmacogenética de la esquizofrenia y de los EPS.	13
5. Tratamiento.	14
6. Antipsicóticos, Aspectos históricos y clasificación.	14

6.1 Efectos secundarios de los antipsicóticos.	16
6.2 Síntomas extrapiramidales (EPS).	16
6.3 Síndromes tardíos.	18
6.4 Consecuencias de los EPS.	18
7. Mecanismos de acción de los antipsicóticos	19
7.1 Unión a los receptores de dopamina D2.	19
7.2 Teoría del antagonismo serotonina-dopamina.	20
7.3 Antipsicóticos y el sistema glutaminérgico.	21
8. Metabolismo de los antipsicóticos.	21
8.1 Variabilidad en el metabolismo de los APs.	23
9. Definición de farmacogenética y farmacogenómica.	25
10. El citocromo CYP2D6.	27
10.1 Polimorfismos en el gen CYP2D6 y riesgo de enfermedades genéticas.	29
11. La serotonina en el sistema nervioso central.	32
11.1 El transportador de serotonina.	32
12. Justificación.	35
13. Objetivos.	36
14. Diseño Metodológico.	37
15. Metodología Experimental.	40
15.1 Extracción de ADN a partir de sangre.	40
15.2 Cuantificación del ADN.	41
15.3 Identificación de los polimorfismos del 5-HTTP-LPR.	42
15.4 Genotipificación de la variante alélica CYP2D6 *4.	45
15.4.1 Restricción enzimática del producto de PCR con <i>BstNI</i>	48
15.5 Genotipificación de la variante alélica CYP2D6 *10.	50
15.5.1 Restricción enzimática del producto de PCR con <i>HphI</i>	53
15.6 Confirmación de la secuencia de los polimorfismos.	55
15.6.1 Purificación del producto de PCR.	55
15.6.2 Marcaje con terminadores fluorescentes.	55

15.6.3 Secuenciación y alineamiento por Clustal W.	56
16. Resultados.	60
16.1 Polimorfismo 5-HTTLPR del gen slc6a4.	62
16.2 Polimorfismos de la variante alélica cyp2d6*4.	67
16.3 Polimorfismos de la variante alélica cyp2d6*10.	72
16.4 Establecimiento del estado metabólico con base en el genotipo.	77
17. Discusión de resultados.	78
18. Conclusiones.	85
19. Apéndice I (Gráficos de frecuencias)	87
20. Apéndice II (Preparación de soluciones).	95
21.- Bibliografía.	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
5-HT	Serotonina
5-HTT	Transportador de serotonina
APs	Antipsicóticos
BstNI	Endonucleasa del tipo II que reconoce la secuencia 5'GGWCC3'
BLAST	"Basic Local Alignment search Tool"
CYPs	Citocromos P450
CYP2D6	Citocromo P450 2D6 (Hidroxilasa de debrisoquina)
cyp2d6*4	Variante alélica 4 para el gen CYP2D6
cyp2d6*10	Variante alélica 10 para el gen CYP2D6
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DMS-IV	Manual estadístico y de diagnóstico de enfermedades mentales IV
DMSO	Dimetil Sulfoxido
dsDNA	ácido desoxirribonucleico de doble cadena
EM	Metabolizador extensivo
EPS	Síntomas extrapiramidales
Hph I	Endonucleasa del tipo II que reconoce la secuencia 5'GGTGA3'
ICD-10	Clasificación estadística internacional de enfermedades relacionadas con problemas mentales
IM	Metabolizador intermedio
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
ml	Mililitros
NDMA	N-metil-D-aspartato.
ng	nanogramos
NIMH	Instituto Nacional de Enfermedades Mentales

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Metabolizador pobre
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SLC6A4	Transportador de serotonina (solute carrier family 6)
SNP	Polimorfismos de un único nucleótido
SSRI	Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina
STRs	Repeticiones cortas en tandem
TD	Discinesia tardía
TEC	Terapia electroconvulsiva
UCM	Universidad Complutense de Madrid.
μl	Microlitros
UM	Metabolizador ultrarrápido
UV	Luz ultravioleta
v	Volts
VNTR	Numero de variable de repeticiones en tandem
λ	Longitud de onda

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Representación de porcentajes relativos de las diferentes enzimas de la familia del citocromo P450 en hígado, así como su participación en el metabolismo de los fármacos.

Fig. 2. Representación de la enzima CYP2D6 de la familia de los citocromos P450 en humano.

Fig. 3. Representación esquemática de los polimorfismos del promotor del transportador de serotonina, tomada de Lesh (1996).

Fig. 4. Representación de la metodología experimental seguida para el estudio de 93 pacientes diagnosticados con esquizofrenia mediante la ayuda del ICD-10 y DMS-IV que fue realizada por el Grupo Medico Carraci. A los pacientes que firmaron un consentimiento informado se les tomo 10 ml de sangre periférica, para la extracción de ADN y determinación de los polimorfismos en estudio, de acuerdo con el siguiente esquema.

Figura 5. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de los amplicones generados de la amplificación específica del polimorfismo 5-HTTLPR que identifica uno los tres genotipos que pueden ser obtenidos.

Figura 6. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % que muestra un amplicón de 334 pares de bases que puede contener la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 caracterizada con el cambio de una guanina por una adenina en la posición 1934 del gen.

Fig. 7. Patrones de restricción para un amplicón de 334 pb que contiene la variante alélica cyp2d6*4.

Figura 8. Electroforésis en geles de agarosa al 3 % que muestra los diferentes patrones de restricción de un amplicón de 334 pb que contiene la variante alélica cyp2d6*4, después

de la digestión con la enzima *BstNI*, los patrones de restricción revelan tres genotipos diferentes al igual que establecen un estatus de metabolismo para el gen *cyp2d6*.

Figura 9. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % que muestra la presencia de un amplicón de 433 pb que puede contener la variante alélica *cyp2d6*10* del gen *cyp2d6*, caracterizada con el cambio de una citosina por una timina en la posición 188 del gen.

Fig. 10. Patrones de restricción para un amplicón de 433 pb que contiene la variante alélica *cyp2d6*10*.

Figura 11. Electroforésis en geles de agarosa al 3 % que muestra los diferentes patrones de restricción después de la digestión con la enzima *HphI* de un amplicón de 433 pb, los patrones de restricción revelan tres genotipos al igual que establecen un estatus de metabolismo para el gen *cyp2d6*.

Fig. 12. Resultados de la comparación de secuencias entre dos amplicones de 484 pb correspondientes al alelo corto (s) del polimorfismo encontrado en el promotor del transportador de serotonina (*slc6a4*).

Fig. 13. En la figura A se muestra la presencia de una timina (G), mientras que en la figura B podemos observar la presencia de una citosina (A), el cambio de la G por A en la posición 1934 del gen *cyp2d6* origina la variante alélica *cyp2d6*4* que codifica para una proteína trunca con actividad nula.

Fig. 14. En la figura A se muestra la presencia de una timina (T), mientras que en la figura B podemos observar la presencia de una citosina (C), el cambio de la C por T en la posición 188 del gen *cyp2d6* origina la variante alélica *cyp2d6*10* que codifica para una proteína con actividad disminuida.

Fig. 15. Alineamiento en Clustal W de una muestra homocigota con el genotipo s/s para el polimorfismo del transportador de serotonina, alineado con la wild type.

Fig. 16. Alineamiento en Clustal W de la secuenciación de muestras homocigotas para el genotipo *4/*4 (P1064, P1051, P964 y P951) del gen *cyp2d6* con una muestra que presenta el genotipo *1/*1 (CYP2D6 wt), en donde puede observar el cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 1934 del gen *cyp2d6*.

Fig. 17. Alineamiento en Clustal W de la secuenciación de muestras homocigotas para el genotipo *10/*10 (P11401 y P11402) del gen *cyp2d6* con una muestra que presenta el genotipo *1/*1 (CYP2D6 wt, P1127, P1191 y P11112), en donde puede observar el cambio de una Citosina por una Timina en la posición 188 del gen *cyp2d6*.

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Riesgo de padecer esquizofrenia y parentesco.

Tabla 2. Factores de riesgo biológico ambiental y esquizofrenia.

Tabla 3. Efectos extrapiramidales en el tratamiento farmacológico con antipsicóticos.

Tabla 4. Frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de CYP2D6 en diferentes grupos étnicos.

Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de CYP2D6 en población mestizo mexicana (1).

Tabla 6. Representación de las variantes alélicas para CYP2D6 describiendo los cambios que sufre la enzima por las mutaciones puntuales.

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para la identificación de 5-HTTLPR

Tabla 8. Reactivos utilizados para la PCR del polimorfismo de la región promotora de SLC6A4

Tabla 9. Condiciones de la PCR del polimorfismo de la región promotora de SLC6A4

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de cyp2d6*4

Tabla 11. Reactivos utilizados para la PCR del polimorfismo de la región promotora de cyp2d6*4

Tabla 12. Condiciones de la PCR de CYP2D6*4

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR de cyp2d6*4

Tabla 14. Reactivos utilizados para la PCR de la variante alélica cyp2d6*4

Tabla 15. Condiciones de PCR para cyp2d6*4

Tabla 16. Porcentaje de pacientes con esquizofrenia que respondieron, respondieron parcialmente y que no respondieron al tratamiento con clorpromazina.

Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina (slc6a4) en pacientes con esquizofrenia.

Tabla 18. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina (slc6a4) de pacientes con esquizofrenia con un grupo control tipificados en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (2).

Tabla 19. Resultados obtenidos de la prueba de X^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

Tabla 20. Frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y el datos fueron comparados con de la prueba de X^2 (B).

Tabla 22. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Tabla 23. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 de pacientes esquizofrénicos con un grupo control tipificado en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (1).

Tabla 24. Resultados obtenidos de la prueba de X^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) de cyp2d6*4 del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

Tabla 25. Frecuencias genotípicas para cyp2d6*4 agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Tabla 26. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*4 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Tabla 27. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Tabla 28. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para la variantes alélica cyp2d6*10 de pacientes esquizofrénicos con un grupo control tipificado en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (1).

Tabla 29. Resultados obtenidos de la prueba de X^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) de cyp2d6*10 del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas para cyp2d6*10 agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Tabla 31. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*10 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Tabla 32. Descripción del estatus metabólico dependiente del genotipo obtenido en cada en los polimorfismos cyp2d6*4 y cyp2d6*10. A. Número de individuos identificados con un fenotipo particular y B. Porcentaje de individuos clasificados por estatus metabólico.

Tabla 26. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*4 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Tabla 27. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Tabla 28. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para la variantes alélica cyp2d6*10 de pacientes esquizofrénicos con un grupo control tipificado en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (1).

Tabla 29. Resultados obtenidos de la prueba de X^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) de cyp2d6*10 del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas para cyp2d6*10 agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Tabla 31. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*10 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Tabla 32. Descripción del estatus metabólico dependiente del genotipo obtenido en cada en los polimorfismos cyp2d6*4 y cyp2d6*10. A. Número de individuos identificados con un fenotipo particular y B. Porcentaje de individuos clasificados por estatus metabólico.

LISTA DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Porcentaje de pacientes con esquizofrenia agrupados por género.

Gráfico 2. Representación de las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 3. Representación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 4. Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en casos y controles.

Gráfico 5. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en casos y controles.

Gráfico 6. Representación de las frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

Gráfico 7. Representación de las frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.

Gráfico 8. Representación de las frecuencias alélicas para la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 9. Representación de las frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 10. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en casos y controles.

Gráfico 11. Comparación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en casos y controles.

Gráfico 12. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

Gráfico 13. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.

Gráfico 14. Representación de las frecuencias alélicas para la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 15. Representación de las frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Gráfico 16. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en casos y controles.

Gráfico 17. Comparación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en casos y controles.

Gráfico 18. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

Gráfico 19. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.

RESUMEN

Las enzimas metabolizadoras de fármacos pertenecientes a la familia del citocromo P450 han sido ampliamente estudiadas en sujetos de diversas etnias, en nuestros días contamos con información muy limitada relacionada con cyp2d6 en poblaciones mestizo mexicanas. La enzima CYP2D6 se encarga de metabolizar cerca del 25% de los fármacos que se consumen habitualmente, dentro de los cuales encontramos a los antipsicóticos. Los polimorfismos genéticos de CYP2D6 juegan un papel muy importante en la variabilidad interindividual e interetnia en lo que a la respuesta a los fármacos se refiere. De igual forma la información farmacogenética en población hispana es muy limitada, incluyendo a los mexicanos y más aun para grupos de pacientes esquizofrénicos. El propósito de este estudio fue identificar la presencia de una de las variantes alélicas *4 y/o *10 de cyp2d6 y la presencia del alelo corto (s) y/o largo (l) del polimorfismo 5-HTTLPT del gen scl6a4 en pacientes con esquizofrenia y correlacionar la información con la respuesta terapéutica al tratamiento con un antipsicótico. En este estudio se tipificaron 92 muestras de pacientes con esquizofrenias por PCR para identificar los polimorfismos corto (s) y largo (l) de promotor del transportador de serotonina SLC6A4 y *4 y 10 del gen cyp2d6 mediante PCR-RFLP. Los resultados obtenidos muestran una frecuencia del 12.90% para la mutante *4 y 14.20% para la mutante *10, resultados muy similares a los encontrados en individuos sanos tipificados previamente (1), mientras que las frecuencias identificadas para el alelo corto (s) y largo (l) para el promotor del transportador de serotonina (slc6a4) son de 45.70% y 53.30 % respectivamente. En conclusión no existen una diferencia significativa entre el grupo de pacientes con esquizofrenia y los grupos control (1, 2) constituidos por individuos sanos y previamente tipificados, de igual forma, no existe correlación entre la presencia de cyp2d6*4, cyp2d6*10 y/o el alelo corto (s) o largo (l) de slc6a4 con respecto a la respuesta terapéutica al tratamiento con antipsicóticos.

INTRODUCCION

1. La Esquizofrenia.

La esquizofrenia es un trastorno fundamental de la personalidad, una distorsión del pensamiento, en otras palabras, es una enfermedad mental compleja y heterogénea con síntomas variables en cada uno de los pacientes. (3)

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Mental (NIMH) la esquizofrenia es una enfermedad del cerebro crónica, grave e incapacitante, que afecta al hombre y a la mujer en la misma proporción. Esta enfermedad tiende a producirse en una edad más temprana en el hombre, entre los 16 y 24 años, mientras que en la mujer generalmente se produce entre los 20 y 34 años. (4)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) esta enfermedad mental afecta a 1 de cada 1000 personas de la población adulta. Aunque la prevalencia de la esquizofrenia es relativamente baja, su manifestación en edades tempranas y su naturaleza crónica hacen que, hoy en día, se considere una de las enfermedades mentales más severas. (5)

Algunos datos relevantes son:

- Afecta a 24 millones de personas en el mundo.
- Es un desorden mental tratable, y el tratamiento se vuelve más efectivo si se inicia en etapas tempranas de la enfermedad.
- Mas del 50% de las personas con esquizofrenia no reciben el tratamiento adecuado.
- 90% de las personas sin tratamiento de esta enfermedad viven en ciudades en desarrollo.

1.1 Consecuencias de la esquizofrenia

El pronóstico heterogéneo de la esquizofrenia ha sido demostrado en varios estudios y sugieren que, sólo el 20% de los pacientes experimentan un único episodio, siendo lo habitual que los pacientes requieran soporte y cuidado a largo plazo, durante toda la vida (5).

La esquizofrenia, y las psicosis en general, afectan desfavorablemente la calidad de vida en varios aspectos, como son la habilidad de los pacientes para iniciar y mantener relaciones personales, conseguir un trabajo remunerado y realizar actividades normales de la vida diaria incluyendo el cuidado personal. No sólo son los pacientes los que padecen las consecuencias de esta enfermedad, sino también sus familiares que sufren sus cargas a nivel económico, emocional y social (5).

Aunque la esquizofrenia es considerada como una enfermedad no mortal, existe el doble de riesgo de morir joven, comparado con la población general. Particularmente, el suicidio es un tema preocupante, ya que se estima que el 10% de los pacientes lo cometen (12 veces mayor riesgo que el de la población general). La esquizofrenia también aumenta el riesgo de comorbilidad debido a enfermedades físicas y al consumo de sustancias de abuso (5).

1.2 Diagnóstico

La necesidad de poder diagnosticar la esquizofrenia con exactitud, impulsa la elaboración de criterios específicos para diagnosticar esta enfermedad. El hecho de que no exista un marcador biológico para la esquizofrenia hace que el diagnóstico de esta enfermedad se base en el examen del estado mental, normalmente a través de la entrevista clínica, y en la observación del comportamiento de los pacientes.

Existen diferentes herramientas que pueden auxiliar en el establecimiento del diagnóstico dentro de la esquizofrenia, siendo los manuales de diagnóstico más utilizados en la actualidad el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition) y el ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision) (6, 7). Según los criterios diagnósticos del DSM-IV-TR, la esquizofrenia consiste en la persistencia de una serie de signos y síntomas característicos durante 6 meses o durante un tiempo menor si se ha tratado satisfactoriamente (3). Es importante obtener una historia meticulosa del paciente y realizar una exploración física para descartar psicosis por causas médicas conocidas. Debido a la sintomatología similar entre la esquizofrenia y otros trastornos mentales, a veces los criterios diagnósticos de estas patologías se superponen. Entre dichas enfermedades se encuentran los trastornos del estado del ánimo con síntomas psicóticos, trastornos de la personalidad, trastorno de despersonalización, trastorno de angustia, trastorno psicótico agudo, trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizotípico y otros más (3).

1.3 Epidemiología.

1.3.1 Incidencia y prevalencia.

Según la OMS, la incidencia anual de la esquizofrenia se sitúa en el 0.22 por cada 1,000 personas, mientras que la prevalencia de esta enfermedad es cerca del 1%. La prevalencia es relativamente elevada si se compara con su incidencia debido a su carácter crónico (3, 8).

Aunque la esquizofrenia es un trastorno que puede comenzar a cualquier edad, entre el 20 y el 40% de los pacientes experimentan los primeros signos psicóticos antes de los 20 años y la proporción de hombres y de mujeres que desarrollan esquizofrenia es el mismo (8).

La incidencia y la prevalencia de la esquizofrenia se mantienen estables entre los diferentes países y culturas. Sin embargo, se ha observado una mayor recuperación de los síntomas y un menor deterioro social en las zonas rurales, lo que puede ser atribuible a factores psicosociales (9).

En México se estimado que existen entre 500 - 700 mil pacientes esquizofrénicos. Su atención no puede llevarse a cabo por un solo sector de la sociedad, por lo es indispensable la participación concertada y decidida de instituciones y organismos públicos sociales y privados para brindar atención a la salud integral de esta población (10).

1.3.2 Mortalidad y comorbilidad.

La mayoría de los estudios concluyen que el paciente con esquizofrenia tiene una morbi-mortalidad más alta que la población en general, quizá por inatención médica, al aumento de abuso de sustancias, principalmente tabaco y alcohol, que condiciona padecimientos

cardiovasculares, cerebrovasculares, oncológicos, hepáticos, gastrointestinales, neumológicos y a enfermedades sistémicas como la Diabetes mellitus. (10)

Los resultados de varios estudios epidemiológicos muestran un exceso de mortalidad entre los pacientes con esquizofrenia, con una media que es de 2 a 4 veces mayor a la de la población general, correspondiendo a una reducción alrededor de un 20% de la expectativa de vida (3, 9).

La causa de muerte más común entre los pacientes esquizofrénicos es el suicidio (11). En México se estima que el 25 % de los pacientes esquizofrénicos tienen intentos de suicidio y el 10 % lo consuma. Otras de las principales causas de muerte son accidentes, lesiones traumáticas y enfermedades médicas entre las que destacan enfermedades cardiovasculares, respiratorias e infecciosas (3).

El consumo de sustancias de abuso constituye el problema de comorbilidad más frecuente entre los pacientes con esquizofrenia. El consumo de alcohol en estos pacientes se presenta en aproximadamente el 30% de los casos, y el abuso de drogas en alrededor del 25% de los casos. La prevalencia de fumadores en los pacientes con esquizofrenia se estima que es del 80%, que es de dos a tres veces mayor que la de la población general (5). En México, mas de la tercera parte de los pacientes con esquizofrenia consumen alcohol, se reporta que un 20% consume marihuana, mientras que un 10 al 15% consume cocaína, y el 50% son fumadores (10).

1.4 Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de la esquizofrenia engloban un amplio espectro de alteraciones de la percepción, el pensamiento, las emociones, la motivación y la actividad motora.

1.5 Síntomas de la esquizofrenia.

Ningún síntoma es patognomónico de la esquizofrenia. Este trastorno se caracteriza por una gran variabilidad y heterogeneidad en sus síntomas, incluso para el mismo paciente, a lo largo de la vida (3). En los años ochenta se clasificaron los síntomas más característicos de la esquizofrenia en dos grandes grupos:

1.5.1 Síntomas positivos:

- *Alucinaciones.* Son percepciones experimentales sin que llegue ningún estímulo externo a los sentidos, cuya calidad es similar a una percepción real.
- *Ideas delirantes.* Son creencias falsas, sostenidas firmemente como reales.

1.5.2 Síntomas negativos:

- *Alogía.* Se caracteriza por una disminución del lenguaje espontáneo, un lenguaje vacío de contenido o de contenido limitado.
- *Aplanamiento afectivo.* Es una reducción en la intensidad de las expresiones y de las respuestas emocionales.
- *Anhedonia.* Que es la incapacidad de experimentar placer.
- *Abulia.* Es la pérdida de la capacidad de iniciar conductas dirigidas a objetivos y acabarlas.
- *Deterioro de atención.* Se pone de manifiesto con la incapacidad de concentrarse o de centrarse en una tarea o una pregunta.

1.6 Clasificación de la esquizofrenia.

Se han definido varios subtipos de esquizofrenia basándose en los síntomas predominantes (3, 12):

- **Tipo paranoide:** se caracteriza por una preocupación por una o más ideas delirantes y/o por la presencia de frecuentes alucinaciones auditivas, y en la que no suelen ser muy marcados el comportamiento o lenguaje desorganizado, el comportamiento catatónico y un afecto aplanado o inapropiado.
- **Tipo desorganizado:** como su nombre indica se caracteriza por una desorganización en el lenguaje y en el comportamiento y por una afectividad aplanada o inapropiada.
- **Tipo catatónico:** en este subtipo los pacientes presentan un trastorno psicomotor evidente, con rigidez y disminución marcada de la actividad motora, aunque en algunos casos puede haber episodios de hiperactividad.
- **Tipo indiferenciado:** en este subtipo se incluyen los pacientes que cumplen criterios de esquizofrenia sin cumplir criterios para su inclusión en los subtipos paranoide, desorganizado o catatónico.

2. Evolución y pronóstico.

El desarrollo de la esquizofrenia es poco predecible, mientras que unas personas sufren un solo episodio psicótico y se recuperan, otras tienen muchos episodios de psicosis en el transcurso de su vida, pero entre dichos períodos llevan una vida normal. Otras personas sufren de esquizofrenia "crónica", la que se manifiesta en forma continua o recurrente, aunque en general la esquizofrenia se considera como un trastorno crónico que comienza en la adolescencia tardía y presenta un mal pronóstico a largo plazo (12). El inicio de la primera crisis puede ser de abrupta o de manera gradual, en donde el individuo puede presentar algunas manifestaciones prodrómicas que puede variar desde semanas a varios

años, como alteraciones del sueño, ansiedad, irritabilidad, depresión, falta de concentración o fatiga (3).

Aproximadamente, entre el 20 y el 30% de las personas solo sufren un episodio a lo largo de su vida, sin embargo, la mayoría sufren varias crisis a lo largo de sus vidas y entre un 10-15% permanecen severamente incapacitados por la enfermedad debido a un estado psicótico crónico (3).

Según la OMS, los predictores más sólidos en la esquizofrenia son:

1. El aislamiento Social
2. Una duración larga del episodio psicótico.
3. Antecedentes de tratamiento psiquiátrico previo.
4. La soltería.
5. Historial de problemas de comportamiento en la infancia.

3. Etiología de la esquizofrenia.

La esquizofrenia es una enfermedad común, severa y discapacitante. El riesgo de padecer la enfermedad durante la vida de una persona es de aproximadamente un 1% a nivel mundial (13). Los estudios epidemiológicos han identificado una serie de factores de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad. Entre ellos se pueden mencionar complicaciones obstétricas y perinatales, atrasos en el desarrollo psicomotor, exposición a virus, nacimiento durante el invierno, bajo coeficiente intelectual, ciertas características de la personalidad y el uso de drogas ilícitas. La heredabilidad de la enfermedad se ha calculado en aproximadamente el 80% (14).

El riesgo a desarrollar esquizofrenia está directamente asociado al grado de parentesco o de carga biológica compartida (13), esto es, los familiares de primer grado de un paciente esquizofrénico presentan un mayor riesgo de sufrir un trastorno del espectro esquizofrénico con respecto a la población en general y que los familiares de segundo grado. A la par, es mayor el riesgo para los gemelos monocigóticos que para los dicigóticos. (15).

Actualmente se acepta que la esquizofrenia es el resultado de una combinación de alteraciones en varios genes, posiblemente cada uno de ellos con un efecto menor, que actúan junto a procesos epigenéticos y factores ambientales, durante el desarrollo del sistema nervioso (14, 16).

3.1 Factores de riesgo genético.

En estudios de familias con hermanos en adopción y gemelos, se demuestra que el riesgo de padecer esquizofrenia en los parientes se correlaciona con el número de genes compartidos y con el grado de parentesco, por lo que se dice que la vulnerabilidad para la esquizofrenia está claramente relacionada con factores genéticos. Comparado con el

riesgo de padecer esquizofrenia a lo largo de la vida en la población general (1%), para los familiares de primer grado de un paciente con esquizofrenia es de aproximadamente un 10% y de un 3% en los de segundo grado. Entre los gemelos, la concordancia de esquizofrenia es de un 17% en los gemelos dicigotos y cerca del 50% para los gemelos monocigotos (9, 12). Se estima que la heredabilidad de la enfermedad es de un 81% (17).

Familiar con esquizofrenia	Riesgo de padecer la enfermedad
Gemelo monocigótico	48%
Gemelo dicigótico	18%
Ambos padres	35%
Un padre	12%
Hermano	12%
Tíos o primos	4%
Población general	1%

Jones P. Cannon M. The new epidemiology of schizophrenia. The Psychiatric Clinics of North Am. 1998, 21: 1-25.

Tabla 1. Riesgo de padecer esquizofrenia y parentesco.

3.2 Factores de riesgo ambientales.

Los factores de riesgo genético representan un punto importante en la etiología de esta enfermedad, el hecho de que los gemelos monocigotos no presenten una concordancia del 100% nos indica que los genes ejercen un papel de susceptibilidad mas no son determinantes de dicha enfermedad.

Se ha observado que los eventos que afectan al desarrollo fetal como la hipoxia, infecciones víricas durante el embarazo, diabetes materna y el estrés materno durante el embarazo pueden estar relacionados a la vulnerabilidad genética y es posible que provoquen por ellos mismos susceptibilidad a la esquizofrenia. También el daño cerebral infantil es relacionado con el riesgo de desarrollar esquizofrenia. (8).

Otros factores que se han asociado al riesgo de padecer esquizofrenia son la clase social, el estrés, el consumo de sustancias de abuso, crecer en un medio urbano, la inmigración, sufrir infecciones víricas y el nacimiento durante los meses de invierno (8).

Situación biológico-ambiental	Riesgo
Preclampsia	9%
Trauma obstétrico	7%
Incompatibilidad Rh o grupo	3%
Desnutrición (2do. Trimestre)	2%
Infección viral materna (2do trimestre)	2%

Jones P. Cannon M. The new epidemiology of schizophrenia. The Psychiatric Clinics of North Am. 1998, 21: 1-25.

Tabla 2. Factores de riesgo biológico ambiental y esquizofrenia.

3.3 Hipótesis moleculares de la esquizofrenia.

La etiología molecular de la esquizofrenia aún no es clara. Durante muchos años la explicación más aceptada se basaba en la hipótesis dopaminérgica, y actualmente continúa siendo la teoría neuroquímica la predominante, aunque en años recientes ha tomado gran importancia el sistema glutaminérgico y el serotoninérgico. Además de estas teorías, se han desarrollado otras basadas en el mecanismo de acción de fármacos y otros principios activos que producen síntomas parecidos a los cuadros psicóticos, y en la interacción de los APs con los receptores.

3.3.1 Hipótesis dopaminérgica.

La teoría dopaminérgica sugiere que los síntomas de la esquizofrenia se deben principalmente a una hiperactividad del sistema dopaminérgico (12). Esta hipótesis fue respaldada inicialmente por la observación en la eficacia de los fármacos antipsicóticos (APs) para tratar la esquizofrenia, se correlacionaba, con su capacidad para bloquear los receptores de la dopamina D2 (17). Posteriormente, fue reforzada por los estudios

indirectos en sistemas dopaminérgicos, como las anfetaminas (sustancias que aumentan la liberación de dopamina), que pueden inducir psicosis en sujetos sanos y provocar síntomas psicóticos en esquizofrénicos a dosis muy bajas. Por lo tanto, según la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia existe una desregulación en la función dopaminérgica, que lleva a una hiperestimulación de los receptores D2 y a una hiperactividad dopaminérgica (18).

Estudios recientes ha permitido reformular esta hipótesis según la cual en los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia podría estar implicado un déficit de la transmisión dopaminérgica a través de los receptores D1 en la corteza prefrontal. La hipótesis dopaminérgica propone que existe un desequilibrio asociado a un déficit en la corteza prefrontal de la función dopaminérgica implicando a los receptores D1 (favoreciendo a los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad). Por el contrario, en la zona subcortical se daría un exceso de la función dopaminérgica implicando a los receptores D2 favoreciendo a la aparición de los estados psicóticos. (18)

3.3.2 Hipótesis glutaminérgica.

La sugerencia de que el glutamato puede estar involucrado con la esquizofrenia ha sido propuesta por estudios realizados con la fenciclidina y la ketamina, potentes antagonistas competitivos del receptor del glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), que producen síntomas psicóticos y negativos en individuos sanos y empeoran los síntomas psicóticos, negativos y cognitivos en pacientes esquizofrénicos. Se ha sugerido que la hipofunción de este receptor está relacionada con la enfermedad (17, 18, 19). Otros estudios han propuesto la disminución de la actividad de los receptores glutaminérgicos localizados en la corteza prefrontal, en el hipocampo y el tálamo, en pacientes esquizofrénicos lo cual se constata en estudios post-mortem de cerebros de pacientes esquizofrénicos, en los que se han encontrado índices anormales de glutamato (18).

3.3.3 Hipótesis serotoninérgica.

Existen estudios en donde se propone que la serotonina (5-HT) podría estar implicada con la esquizofrenia, debido a observaciones del uso del LSD (dietilamida del ácido lisérgico), que es un alucinógeno, un psicotomimético y un agonista del receptor de la 5-HT (20). Esta hipótesis también prosperó por el hallazgo de que el antipsicótico clozapina, y después otros APs atípicos, presentan afinidades relativamente elevadas por los receptores de la serotonina (21).

En estudios post-mortem con pacientes esquizofrénicos no medicados se ha observado una alteración en el número de receptores de la serotonina en el cerebro presentando una menor expresión del receptor 5-HT_{2A} y una mayor presencia de los receptores 5-HT_{1A} en la corteza frontal (21).

4. Genética y farmacogenética de la esquizofrenia y de los EPS.

La esquizofrenia es una enfermedad multifactorial con una marcada base genética. Esta enfermedad poligénica presenta un modelo de heredabilidad complejo no mendeliano, en donde varios genes de susceptibilidad con efectos moderados se involucran en su patogénesis (21).

Gran parte de los estudios genéticos de enfermedades psiquiátricas, relacionados con la etiología de la enfermedad, así como con la respuesta al tratamiento con fármacos, se han centrado en genes funcionales seleccionados a partir de evidencias neurofarmacológicas. En el caso de la esquizofrenia, los genes que se han recibido una mayor atención son aquellos involucrados en la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica, incluyen los que codifican para sus receptores, los involucrados en su almacenamiento, síntesis, transporte, degradación, así como los que participan en el metabolismo de los fármacos

APs. Otros sistemas que también se han estudiado han sido el glutaminérgico, el GABAérgico y genes de la neuromodulación y del neurodesarrollo (21, 22).

5. Tratamiento.

Dado que las causas de la esquizofrenia aún se desconocen, el tratamiento de esta enfermedad se centra en la eliminación de sus síntomas. La terapia de la esquizofrenia tiene tres componentes principales:

- a) la medicación con fármacos antipsicóticos (APs) para aliviar y prevenir los síntomas.
- b) intervenciones psicosociales para ayudar a los pacientes y a los familiares a hacer frente a la enfermedad y sus complicaciones.
- c) la rehabilitación para ayudar a los pacientes a su reintegración en la comunidad y a recuperar su funcionamiento ocupacional.

En el tratamiento se utilizan otros fármacos junto con los antipsicóticos de la esquizofrenia. Algunos ejemplos son las benzodiazepinas, fármacos beta-bloqueadores como el propranolol, el carbonato de litio, la carbamazepina, el valproato sódico y los antidepresivos. La terapia electroconvulsiva (TEC) se puede utilizar para el tratamiento de algunos síndromes específicos como la catatonía y para pacientes que no responden a los fármacos antipsicóticos (12).

6. Antipsicóticos., Aspectos históricos y clasificación.

El tratamiento de la esquizofrenia se ha realizado desde 1952 con antipsicóticos como la clorpromazina. La actividad terapéutica de este fármaco en pacientes esquizofrénicos se descubrió en 1947, gracias a las observaciones del cirujano francés Laborit, quien utilizó varias sustancias, incluyendo la prometazina, por su capacidad de aliviar los signos de estrés, encontrando que dicho fármaco tenía un efecto tranquilizante en pacientes

sometidos a cirugía, y que este era distinto de la sedación (12). Posteriormente, se llevaron a cabo estudios con la finalidad de obtener sustancias con una mayor eficacia, se obtuvo la clorpromazina, cuyo efecto antipsicótico fue demostrado por Delay y Deniker en 1953, quienes observaron que controlaba los síntomas de los pacientes psicóticos sin sedarlos excesivamente. Además del efecto tranquilizante de la clorpromazina, el tratamiento con este fármaco producía efectos secundarios motores parecidos a los que presentan los enfermos de parkinson. Al descubrimiento de la clorpromazina como fármaco con actividad antipsicótica, siguió el desarrollo de nuevas sustancias entre las que destacó el haloperidol, por su extenso uso (23).

El término antipsicótico (AP) fue usado hasta el año 1963, con base en las investigaciones realizadas por Carlsson sobre el efecto clínico de la clorpromazina y el haloperidol. El descubrimiento de la clozapina en la década de los setenta marcó una nueva era en el esquema de tratamiento de la esquizofrenia y dio origen a un nuevo grupo de fármacos que se conocen con el nombre de APs atípicos. Estos nuevos fármacos se desarrollaron en respuesta a los problemas existentes con los APs clásicos, como la falta de eficacia en algunos pacientes, la poca mejoría de los síntomas negativos e importantes efectos secundarios, incluyendo los efectos extrapiramidales (EPS) (23). La clozapina era un fármaco atípico en el sentido que no causaba efectos extrapiramidales en los pacientes o catalepsia en los animales y no producía elevación de la hormona prolactina.

No obstante, la utilización de la clozapina quedó limitada debido a los serios efectos secundarios que provocaba, como la agranulocitosis (24). Por lo que, en los años noventa, se a cabo la síntesis de nuevos APs atípicos, imitando el perfil farmacodinámico de la clozapina y evitando sus efectos adversos (24).

En términos generales podemos mencionar que los fármacos APs actúan mejorando o suprimiendo el síndrome esquizofrénico, especialmente los síntomas positivos y

reduciendo el riesgo de recaídas mientras se mantenga el tratamiento. Cuando dicha medicación es interrumpida, incluso tras varios años de terapia efectiva, el riesgo de recaída aumenta entre el 60 al 70%. (11, 25). Los fármacos APs típicos, como la clorpromazina y el haloperidol, varían en su potencia, en sus propiedades farmacológicas y en su capacidad de inducir efectos adversos, pero presentan una eficacia similar en el tratamiento de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia y en prevenir su recurrencia. No obstante, aproximadamente el 30% de los pacientes con síntomas psicóticos agudos, presentan poca o ninguna respuesta a los APs típicos, más del 60% presentan una respuesta parcial a la medicación y aproximadamente el 20% pueden sufrir recaídas (17).

6.1 Efectos secundarios de los antipsicóticos.

Desde su introducción en la práctica clínica, el tratamiento con los fármacos APs se ha asociado con efectos secundarios que han llevado a problemas como el abandono al tratamiento y el rechazo social. El primer agente que se sintetizó, la clorpromazina, actúa sobre varios receptores colinérgicos y monoaminérgicos dando lugar a una variedad de efectos secundarios como sequedad de boca, problemas de motilidad intestinal, urinarios, sedación y complicaciones cardiovasculares. Al demostrarse que estos agentes efectuaban su respuesta antipsicótica por el bloqueo de los receptores D2, las investigaciones se dirigieron a desarrollar antagonistas selectivos de los receptores D2, como el haloperidol. Sin embargo, el aumento de la potencia hacia los receptores D2 propicio un aumento del riesgo de desarrollar trastornos del movimiento llamados efectos extrapiramidales (extrapyramidal symptoms, EPS) (24).

6.2 Síntomas extrapiramidales (EPS).

Los efectos extrapiramidales (EPS) se sitúan entre los efectos secundarios más frecuentes experimentados con los APs convencionales.

Estos consisten en alteraciones del movimiento y se pueden clasificar en EPS agudos y síndromes tardíos. Los EPS agudos consisten en tres síndromes diferentes: el parkinsonismo, la acatisia y la distonía, siendo efectos con una aparición relativamente aguda (entre las primeras semanas del inicio de la terapia y nunca después de los dos meses) y reversibles con la aplicación de una serie de medidas. Todos estos tipos de trastornos se pueden manifestar aislados o en forma de síndrome mixto. Los síntomas tardíos incluyen la distonía y la discinesia tardía (TD), normalmente son de carácter irreversible y con una aparición posterior a los 3 a 6 meses del inicio del tratamiento, aunque lo más frecuente es que aparezcan tras 1-2 años. Más del 90% de los pacientes tratados con APs típicos desarrollan EPS agudos y cerca del 20% desarrollan TD, lo que supone una prevalencia cuatro veces mayor a la prevalencia de la discinesia espontánea en individuos no tratados (26).

EPS	Señales
Parkinsonismo:	El síndrome parkinsoniano presenta una gran similitud con los síntomas de la enfermedad de Parkinson idiopática clásica: disminución de la expresión facial (cara de máscara), rigidez, enlentecimiento de los movimientos (bradicinesia), sialorrea (flujo exagerado de saliva), temblor y alteración de los reflejos posturales
Acatisia:	La acatisia es un efecto secundario que puede incluir signos objetivos de hiperactividad motora como incapacidad de permanecer sentado quieto o balancearse adelante y atrás, y una sensación subjetiva de inquietud, ansiedad y necesidad de moverse (13). La aparición de estos efectos suele ser al cabo de pocas horas o días de iniciar el tratamiento, aunque también se pueden dar después de una prolongada exposición (acatisia tardía).
Distonía aguda:	Las reacciones distónicas agudas se encuentran entre las reacciones adversas más molestas e incapacitantes que pueden aparecer en el tratamiento con APs. Estas se caracterizan por la presencia de espasmos musculares prolongados que causan movimientos repetitivos o sostenidos de carácter torsional y que provocan la aparición de posturas anómalas (13). La tensión muscular incontrolada, típicamente conlleva espasmos del cuello, la espalda, la lengua o los músculos que controlan el movimiento lateral de los ojos, aunque también pueden tener una afectación axial o incluso generalizada.

Tabla 3. Efectos extrapiramidales en el tratamiento farmacológico con antipsicóticos.

6.3 Síndromes tardíos:

Los síndromes tardíos incluyen la discinesia y la distonía tardía. La discinesia tardía consiste en movimientos o posturas anormales e involuntarias de determinadas zonas musculares de tipo coreico y suelen afectar fundamentalmente la musculatura craneal en forma de movimientos bucolinguomasticatorios. En el caso de la distonía tardía, los movimientos son sostenidos y suelen afectar la musculatura cervicocraneal, aunque también pueden afectar tronco y extremidades (28).

6.4 Consecuencias de los EPS.

Las alteraciones del movimiento inducidos por el tratamiento AP, como los EPS iatrogénicos, son un importante problema para los pacientes, debido a que además de la incapacidad física por las alteraciones del movimiento, esta sintomatología también da lugar a un rechazo social, supone un obstáculo para la rehabilitación y genera pocas perspectivas en la búsqueda de empleo, reduciendo así la calidad de vida. Además, la presencia de los EPS puede llevar a tratamientos fallidos ya que esta sintomatología conlleva un abandono al tratamiento con recaídas, reingresos, o bien largas hospitalizaciones, que desde el punto de vista económico supondrán un mayor gasto sanitario. Se estima que el 42% de los pacientes abandonan el tratamiento dentro de los dos años de su inicio. En el caso de los EPS se ha dado una subestimación de la influencia de estos efectos adversos en el abandono al tratamiento con APs; en un estudio se puso de manifiesto que el 37% de los pacientes abandono el tratamiento por los efectos indeseables de los APs (26).

Un problema añadido a la aparición de los EPS es que estos efectos adversos a menudo conllevan la medicación con otros fármacos que pueden provocar interacciones farmacológicas. Ciertos grupos de pacientes, como los ancianos, los adolescentes y pacientes con daños neurológicos como los que presentan demencia o cualquier forma de

parkinsonismo, presentan un riesgo más elevado a este tipo de efectos secundarios. Se ha encontrado que \approx 50% de los pacientes ancianos tratados con APs típicos experimentan EPS, y que la incidencia de estos efectos secundarios está relacionada con el número de años de exposición. Los enfermos con enfermedad de Parkinson son la población de mayor riesgo de desarrollar EPS (26).

7. Mecanismos de acción de los antipsicóticos

La búsqueda de los factores que contribuyen a la actividad antipsicótica atípica ha sido y es, un tema complejo ya que con la excepción del amisulpiride, estos fármacos muestran efectos en múltiples receptores además de sus efectos sobre los receptores D2. Esta heterogeneidad en el perfil farmacológico de los APs atípicos ha llevado a pensar que no existe un único factor que contribuya a las características atípicas de los APs, lo que ha conducido al desarrollo de diversas teorías para poder explicar el carácter atípico de los APs. (26)

7.1 Unión a los receptores de dopamina D2.

El bloqueo de las vías dopaminérgicas es actualmente una de las principales teorías del mecanismo de acción de estos fármacos. Se ha demostrado que los APs, tanto los típicos como los atípicos, muestran afinidades por el receptor D2 y la magnitud de esta afinidad in vitro es el mejor predictor de la respuesta en una situación clínica (24). Los estudios funcionales han demostrado la importancia de la ocupación de estos receptores para predecir la respuesta de los APs, sugiriendo la existencia de una ventana terapéutica para la mayoría de los APs. El nivel óptimo para una respuesta farmacológica requiere un bloqueo del 60-65%, sin embargo cuando la ocupación es mayor al 80% el tratamiento farmacológico se asocia con un aumento de la incidencia de los EPS (17). Además, aunque la clozapina (AP atípico por excelencia) presenta ocupaciones elevadas del receptor serotoninérgico 5-HT₂, su eficacia solo se presenta con niveles plasmáticos del receptor

D2 del 50-60% (23). Esta teoría, intenta explicar el hecho de que se encuentren no respondedores al tratamiento, a pesar de una ocupación adecuada de los receptores D2. En pacientes que llevan tiempo medicándose por un tiempo prolongado con APs se puede inducir una “sobre-regulación” o hipersensibilidad de los receptores D2, haciendo que se necesiten un aumento en las dosis para producir el mismo efecto en la transmisión dopaminérgica en los pacientes crónicos (17).

Posteriormente se demostró que algunos pacientes que respondían bien al tratamiento antipsicótico mostraban bajos niveles de bloqueo D2, lo cual indica que el bloqueo de los receptores D2 y la eficacia clínica observada no siempre siguen una relación lineal. Se ha demostrado que, aunque todos los APs con una eficacia clínica poseen cierto grado de antagonismo por los receptores D2, la mayor parte de ellos tienen afinidad por distintos receptores de otros sistemas de neurotransmisión por lo que es probable que también haya otros sistemas implicados en el efecto terapéutico de los fármacos antipsicóticos (23).

7.2 Teoría del antagonismo serotonina-dopamina:

Una propiedad de todos los APs atípicos es su elevado cociente de afinidad 5-HT_{2A}/D₂. Según la teoría del antagonismo serotonina-dopamina, esta característica proporciona a los APs atípicos tanto su protección frente a los EPS como su superioridad en los síntomas negativos. La localización de los receptores 5-HT_{2A} es principalmente en la corteza prefrontal y se ha observado que una estimulación de estos receptores actúa como freno de la transmisión dopaminérgica en esta zona, por lo que el uso de un fármaco que los antagonice, facilitará la transmisión dopaminérgica mejorando los síntomas negativos y evitando la aparición de EPS (29). También ha sido observado un efecto sinérgico en el antagonismo de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} que produce un aumento de la función dopaminérgica prefrontal, efecto que no se observa cuando se administran antagonistas

selectivos para estos receptores. Se ha propuesto la participación de los receptores 5-HT_{1A}, debido a un bloqueo de este efecto sinérgico con antagonistas 5-HT_{1A} (18).

7.3 Antipsicóticos y el sistema glutaminérgico:

Las observaciones experimentales de que algunos de los APs atípicos, pero no los típicos, antagonizan los efectos de la hipofunción del receptor del glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), similares a los que se presentan en la esquizofrenia, han hecho pensar que uno de los mecanismos terapéuticos de acción de los APs atípicos es contrarrestar los efectos de la hipofunción de los receptores NMDA. Aunque no se conoce el mecanismo por el que se median estos efectos, se ha sugerido que la N-desmetilclozapina (el metabolito activo de la clozapina), potencia la función de los receptores NMDA mediada por su agonismo a los receptores muscarínicos M₁ (17).

8. Metabolismo de los antipsicóticos.

El objetivo principal del metabolismo de los fármacos es facilitar su inactivación y su eliminación del organismo, aunque el metabolismo también puede resultar en la formación de metabolitos activos que tienen propiedades farmacológicas similares a las del compuesto inicial o con acciones biológicas diferentes.

El hígado es el principal órgano en donde se llevan a cabo las reacciones metabólicas de los fármacos, aunque también se pueden dar en otros tejidos como el riñón, el cerebro, la piel, la sangre, los pulmones y la mucosa gastrointestinal. La mayoría de los fármacos son transformados mediante reacciones denominadas de fase I y de fase II. Las reacciones de la fase I normalmente se dan por oxidación, reducción o hidrólisis y tienen la finalidad de convertir a la molécula del fármaco en un metabolito más reactivo y adecuado para los procesos de la fase II. Las reacciones de la fase II consisten en la inactivación del fármaco a través de reacciones de conjugación con sustancias endógenas como el ácido glucurónico,

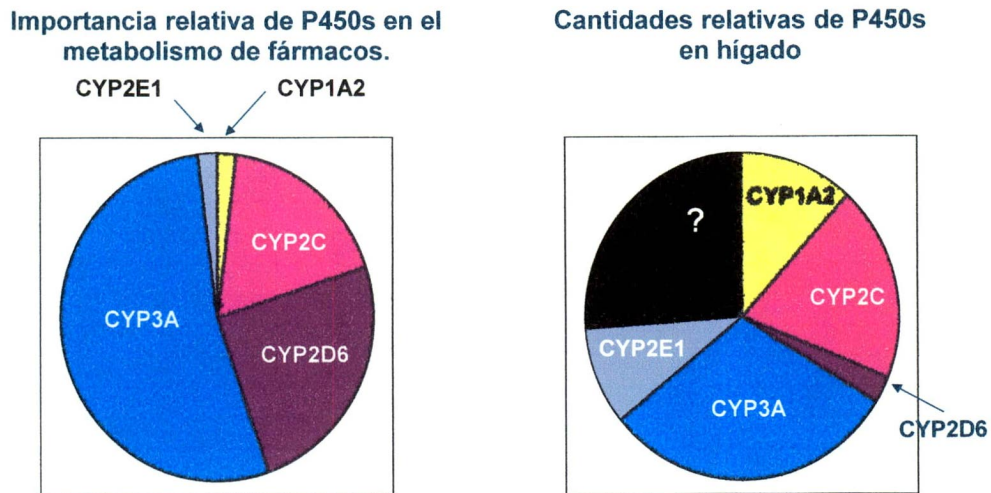
aminoácidos, ácidos grasos, el glutatión, grupos metilo, sulfato o acetato, facilitando así su excreción (30).

Las reacciones de oxidación son las más importantes dentro de las reacciones de la fase I y están mediadas por una superfamilia de monooxigenasas que contiene un grupo hemo denominada sistema citocromo P450 (CYPs). Se han identificado aproximadamente 107 genes CYPs humanos: 59 activos y cerca de 48 pseudogenes, que se agrupan en 18 familias y 42 subfamilias. La nomenclatura de esta superfamilia se basa en nombrar a los citocromos P450 con las letras CYP seguido por un número que indica la familia génica, una letra que indica la subfamilia y un número para el gen. Los CYPs, con una homología de secuencia igual o superior al 40%, se clasifican en la misma familia, y los que comparten una homología de secuencia del 55% o mayor se clasifican en la misma subfamilia. Para tener el mismo número de gen, los genes deben tener la misma función y exhibir una elevada conservación (30). Los CYPs humanos se pueden dividir en tres grupos principales:

- 1) Los que pertenecen a las familias CYP 1-3, son responsables del 70-80% del metabolismo de los fármacos utilizados en la clínica, tienen menos afinidad para sus sustratos, son conservados en la evolución y exhiben polimorfismos genéticos;
- 2) Los de la familia 4 participan en el metabolismo de los ácidos grasos y sustratos relacionados y en el metabolismo de algunos xenobióticos;
- 3) Los que pertenecen a las familias restantes son importantes para el metabolismo de sustancias endógenas, tienen una elevada afinidad para los sustratos y presentan relativamente una elevada conservación durante la evolución.

Los CYPs varían en su abundancia en el hígado. No obstante, los citocromos CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4 realizan del 60-70% de la biotransformación metabólica de la fase I de los fármacos. Como se puede observar en la **Figura 1**, no hay una relación entre la cantidad hepática de enzimas metabólicos y su importancia en el metabolismo de los

fármacos. Por ejemplo, el citocromo CYP2D6 es una de las enzimas metabólicas más importantes en el metabolismo de los fármacos y es una de los menos abundantes en el hígado (31).



Shimada T et al. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(1):414.

Fig. 1. Representación de porcentajes relativos de las diferentes enzimas de la familia del citocromo P450 en hígado, así como su participación en el metabolismo de los fármacos.

8.1 Variabilidad en el metabolismo de los APs.

La elevada variabilidad interindividual en la biotransformación de los APs, da lugar a concentraciones plasmáticas muy diferentes durante el tratamiento a dosis fijas. Esta variabilidad se puede atribuir parcialmente a factores genéticos, medioambientales y patofisiológicos que influyen en la farmacocinética y en la farmacodinamia de los fármacos. (32).

La asociación entre la respuesta clínica a la terapia con APs y los polimorfismos que afectan a la capacidad metabólica se ha demostrado en diversos estudios (32, 33, 34). A partir de dos estudios realizados en los años setenta, en lo que se utilizó como fármaco la

debrisoquina y la esparteína, se determinó los pacientes se podían clasificar en dos grupos en base a su habilidad para metabolizar estos fármacos; los grupos se denominaron metabolizadores pobres (PM) y metabolizadores extensivos (EM) de la debrisoquina hidroxilasa. Posteriormente se demostró que las bases moleculares de esta variabilidad se podían explicar por polimorfismos localizados en el gen que codificaba la isoforma CYP2D6 (33).

Estudios tanto prospectivos como retrospectivos, sugieren que los pacientes con una capacidad metabólica disminuida determinada genéticamente, pueden alcanzar concentraciones plasmáticas de los APs muy elevadas, que se pueden asociar con los subsiguientes efectos adversos. Particularmente, en el caso del CYP2D6, se ha relacionado el fenotipo PM con un exceso de sedación, hipotensión postural, efectos autonómicos y EPS, así como con hospitalizaciones más largas y tratamientos más costosos por el mayor riesgo de presentar efectos adversos. (34)

La inhibición y la inducción de los CYPs son la causa de las interacciones farmacológicas más comunes y una de las causas de la variabilidad en la respuesta a los fármacos. La administración de varios fármacos puede llevar a la manifestación de efectos adversos o a modificaciones en su eficacia, debido a que un fármaco (o sus metabolitos) puede ser un sustrato, un inhibidor o un inductor del mismo CYP que lo metaboliza o puede alterar la actividad de un CYP específico sin ser su sustrato. Por ejemplo, los APs perferacina, clorpromazina y haloperidol y los antidepresivos tricíclicos inhiben mutuamente su metabolismo, al igual que entre la clozapina y los inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRIs). La mayoría de los CYPs son inducibles con la excepción del citocromo CYP2D6 (30).

Los CYPs localizados en el cerebro, el órgano blanco de estos fármacos, también pueden jugar un papel importante en las concentraciones locales de los APs, a pesar de que los

niveles de los CYPs en el cerebro sean bajos comparados con los del hígado. Esto se debe a que los CYPs se pueden encontrar en mayores concentraciones en regiones específicas que en el cerebro (35).

9. Definición de farmacogenética y farmacogenómica

Muchos pacientes muestran una variabilidad interindividual en relación a la respuesta a fármacos y su toxicidad. Una proporción considerable de pacientes no responde a ciertos fármacos (antagonistas β adrenérgicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, β agonistas y los antidepresivos tricíclicos) administrados a dosis convencionales, responde parcialmente a ellos o presenta reacciones adversas. La concentración plasmática de tales drogas puede variar hasta 600 veces en individuos del mismo peso y que toman la misma dosis (36).

Esta variación puede ser de origen genético, fisiológico, fisiopatológico o ambiental, pero la absorción, distribución y metabolismo de los fármacos, así como sus interacciones con sus blancos pueden ser determinadas por diferencias genéticas. En general se calculan que los factores genéticos tienen una participación de 15-30% en las diferencias interindividuales de la respuesta y metabolismo de los fármacos, pero para algunos medicamentos su participación en la variabilidad de la disposición y efectos de los fármacos es hasta del 95% (37).

Primero se demostró la relación entre las reacciones adversas de los fármacos y las variaciones determinadas genéticamente y fue hasta 1959, que Vogel introdujo el término "Farmacogenética" para este nuevo campo de investigación. La farmacogenética se define como el estudio de las variaciones genéticas que causan una variabilidad en la respuesta a los fármacos. Los estudios de farmacogenética se basan en la investigación de genes candidatos seleccionados por estar involucrados biológicamente en la cinética o por su relación con la acción farmacológica. De hecho, las variaciones genéticas se pueden dividir

en aquellas que afectan a los procesos farmacocinéticos y aquellas que afectan a los procesos farmacodinámicos. El objetivo final de esta disciplina es identificar individuos de riesgo para un efecto adverso o individuos con probabilidad de resistencia al tratamiento (38, 39).

En la esquizofrenia, se han realizado varias investigaciones para identificar factores genéticos que pueden influir en la respuesta y los efectos adversos del tratamiento con fármacos APs. A nivel farmacocinético, se han estudiado polimorfismos en varias enzimas metabolizadores de fármacos como los citocromos CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6. A nivel farmacodinámico, los receptores de la dopamina y de la serotonina son los que se han estudiado más extensamente.

Un polimorfismo genético se define como la coexistencia de múltiples alelos en un mismo locus, con una frecuencia mayor o igual al 1% entre la población. El tipo más común de variación genética, representando aproximadamente un 90% del total de variaciones en el genoma humano, es el denominado polimorfismo de un único nucleótido (SNP: Single Nucleotide Polymorphism), en donde la secuencia de DNA entre los individuos difiere por una única base. Se ha estimado una frecuencia de 1 SNP por cada 1.250 pares de bases que corresponde a un total de 2.5 millones de SNPs entre dos individuos.

Otros tipos de polimorfismos genéticos resultan de la inserción o de la delección de una base o de una sección de DNA. El tipo más común de estos polimorfismos de inserción/delección son repeticiones de un número variable de bases o de patrones de nucleótidos en una región genética. Los patrones de bases repetidas pueden ir desde 16 a cerca de 100 pb, conocido como "minisatélites o VNTRs (variable number of tandem repeat) a los más comunes "microsatélites" que consisten en 2, 3 o 4 nucleótidos repetidos en un número variable de veces. Los microsatélites a menudo se refieren como "short tandem repeats" (STRs). Otro tipo de polimorfismo de inserción/delección incluye la

presencia o la ausencia de segmentos Alu en una localización genética. Estos segmentos consisten en dos secuencias de una longitud aproximadamente de 120 - 150 pb separadas por un segmento rico en la base adenina.

10. El citocromo CYP2D6.

Las enzimas citocromos P450 son hemoproteínas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos y otras células corporales, dentro de su estructura general poseen un sitio de reconocimiento del oxígeno, el dominio hemo y un sitio de unión a sustratos. Las enzimas del sistema citocromo P450 tienen función de monoxigenasas, insertan un átomo de oxígeno atmosférico a sus sustratos creando un nuevo grupo funcional (-OH, -NH₂, -COOH), para convertirlos en moléculas electrofílicas. La estructura tridimensional se caracteriza por la presencia de hélices α y hojas β (30). La superfamilia génica citocromo P450 comprende 70 familias constituidas por 100 enzimas que se han encontrado en bacterias, plantas, lavaduras, insectos y vertebrados, de las cuales 14 familias se encuentran en mamíferos con aproximadamente 60 genes, pero sólo un subgrupo es responsable del metabolismo de la mayoría de los fármacos como son: CYP1A2, 2A6, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 y CYP4A11 (42).

Las enzimas CYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19 y CYP3A4 participan en el metabolismo de los antidepresivos y se estima que hasta 25% de fármacos de uso clínico incluyendo los antidepresivos, son metabolizados por CYP2D6. Los antidepresivos tricíclicos son sustratos de CYP2D6 para su hidroxilación e inactivación, mientras que los antidepresivos de la clase ISRS principalmente paroxetina y fluoxetina son inhibidores de CYP2D6, de modo que la administración concomitante de tricíclicos con inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina (SSRI) puede llevar a niveles tóxicos de los primeros (44).

La CYP2D6 originalmente llamada hidroxilasa de debrisoquina, es un polipéptido de 497 aminoácidos que tiene una participación muy importante en el metabolismo de drogas,

los sustratos del CYP2D6 son bases lipofílicas con un átomo de nitrógeno y la reacción de hidroxilación se lleva a cabo en el aminoácido Asp301 de carga negativa, responsable de la unión del sustrato a dicho nitrógeno. (22) El gen *cyp2d6* contiene 9 exones y ha sido mapeado en 22q13.1, en tal locus CYP2D6 contiene 2 pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8 con una homología del 97% y del 92%, respectivamente (21, 41).

Fenotípicamente existe una elevada variabilidad en la capacidad de metabolización del citocromo CYP2D6, que se puede explicar por los polimorfismos en este gen, ya que los cocientes metabólicos de un individuo son estables en el tiempo, indicando una influencia limitada de los factores medioambientales o fisiológicos en la actividad de la enzima (42)



Fig. 2. Representación de la enzima CYP2D6 de la familia de los citocromos P450 en humano.

Hasta ahora, han sido identificados más de 80 polimorfismos en el gen CYP2D6 que se pueden clasificar en diferentes categorías según sus consecuencias en la actividad de la enzima: actividad nula, disminuida, normal o incrementada (<http://www.imm.ki.se/cypalleles/>). La presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes que codifican enzimas metabolizadoras puede llevar a la pérdida de función enzimática, causando falta de respuesta farmacológica, una alta concentración de la droga y toxicidad (43).

10.1 Polimorfismos en el gen CYP2D6 y riesgo de enfermedades genéticas.

Varios estudios han descrito una asociación entre los polimorfismos en el gen CYP2D6 y diversas enfermedades, algunos han descrito una asociación entre el genotipo PM y el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (45), aunque en otros no se ha encontrado ninguna asociación entre los polimorfismos en el CYP2D6 y esta enfermedad (46). También se ha descrito una asociación entre los polimorfismos en el gen CYP2D6 y la enfermedad de Alzheimer o la epilepsia, mientras que otros estudios han encontrado evidencias de una asociación entre el genotipo PM del CYP2D6 y ciertas características de la personalidad y por último aquellos que describen una mayor proporción de PM en pacientes esquizofrénicos comparado con controles poblacionales, la mayoría de los estudios no lo confirman (47, 48).

Los efectos secundarios incrementan la morbilidad y mortalidad causando más de 100,000 muertes al año y hasta 5% de las hospitalizaciones en EUA. (49) La presencia de (SNPs) en los genes que codifican enzimas metabolizadoras puede llevar a la pérdida de función enzimática, causando falta de respuesta farmacológica, una alta concentración de la droga y toxicidad (50).

Actualmente se conocen más de 70 polimorfismos de la enzima, los alelos más comunes en varios grupos étnicos son CYP2D6*2, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*10, CYP2D6*17 y CYP2D6*41. El alelo más frecuente en Asia y el mundo es CYP2D6*10 que tiene una mutación en P345 que modifica la secuencia PPGP necesaria para el plegamiento de P450, haciéndola inestable y reduciendo su afinidad a los sustratos (51).

En Europa la incidencia de metabolizadores lentos es de aproximadamente 7% y los metabolizadores ultrarrápidos se encuentran localizados en el Área Mediterránea, donde el 10% de la población en Portugal, España e Italia son portadores de alelos con múltiples

copias del gen CYP2D6. Los alelos CYP2D6*3, CYP2D6*4 y CYP2D6* formen el 95% de los metabolizadores lentos (52).

En México, existen estudios en donde se han calculado las frecuencias alélicas de CYP2D6 y encontrado que los alelos más frecuentes CYP2D6*2, *4 y *10 (53).

Los patrones de actividad de los diferentes alelos de CYP2D6, pueden resumirse de la siguiente forma: CYP2D6*1, *2, *33 y *35 con actividad enzimática normal, CYP2D6*3, *4, *6, *7 y *8 con actividad nula, CYP2D6*9, *10, *17 y *41 con actividad enzimática reducida y CYP2D6*5 deleción de la enzima. Además, han sido descritos alelos con 2-13 copias génicas que presentan un metabolismo ultrarrápido, éstos impiden alcanzar los niveles plasmáticos requeridos a las dosis terapéuticas, mientras que los que han perdido la función enzimática metabolizan lento y tienen mayor riesgo de presentar efectos adversos.

En Europa se estima que 25 millones de pacientes requieren de dosis altas de antidepresivos por ser metabolizadores lentos, y 20 millones más tienen el riesgo de no responder al tratamiento. Resultados de estudios de farmacocinética sugieren el ajuste de dosis de los antidepresivos, disminuyendo del 28-60% de la dosis habitual en metabolizadores pobres e incrementado la dosis de 140% hasta 180% en los metabolizadores ultrarrápidos (40).

Alelo	Caucásicos	Asiáticos	Africanos	Árabes
CYP2D6*2nx	1-5%	0-2%	2%	10-16%
CYP2D6*4	12-21%	1%	2%	1-4%
CYP2D6*5	2-7%	6%	4%	1-3%
CYP2D6*10	1-2%	51%	6%	3-9%
CYP2D6*17	0%	0%	20-35%	3-9%

Tabla 4. Frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de CYP2D6 en diferentes grupos étnicos.

Alelo	Frecuencia (%)
CYP2D6 *2	19.34
CYP2D6 *3	1.44
CYP2D6 *4	11,21
CYP2D6 *5	2.67
CYP2D6 *10	12.45

Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos más frecuentes de CYP2D6 en población mestizo mexicana (1).

Alelo	Mutación	Fenotipo
CYP2D6*2nx	Multiduplicación génica	Actividad incrementada
CYP2D6*4	Defectos en el "splicing"	Enzima inactiva
CYP2D6*5	Delección génica	Falta de enzima
CYP2D6*10	P34S, S486T	Enzima inestable
CYP2D6*17	T107I, R296C, S486T	Afinidad por sustratos alterada

Tabla 6. Representación de las variantes alélicas para CYP2D6 describiendo los cambios que sufre la enzima por las mutaciones puntuales.

11. La serotonina en el sistema nervioso central

Ha sido propuesto que la desregulación de la serotonina se encuentra implicada en una variedad de desordenes del humor y el comportamiento, por lo que el transportador de la serotonina es un mecanismo clave en la regulación de la actividad serotoninérgica, razón por la cual se ha puesto mucha atención en el descubrimiento de variaciones en la función de este transportador tratando de elucidar variaciones interindividuales en la respuesta al tratamiento de enfermedades mentales (51). En el sistema nervioso central la serotonina es sintetizada en neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el tronco cerebral del núcleo rafe, en el cual las neuronas 5-HT forman vías complejas.

11.1 El transportador de serotonina.

El transportador de serotonina 5-HTT es un componente clave en la magnitud y duración de la transmisión serotoninérgica en el sistema nervioso central, y es el sitio de acción de los inhibidores de la recaptura de la serotonina (SSRIs) utilizados en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas. Variaciones en la respuesta al tratamiento a los SSRIs han sido correlacionados con un polimorfismo bi-alelico presente en la región del promotor (5-HTTLPR), que modula la eficiencia transcripcional del gen 5-HTT. Los alelos, designados como largo (l) y corto (s), resultan en tres posibles genotipos: l/l, l/s y s/s. Con respecto al alelo (s) se tiene la hipótesis de que cuenta con un efecto funcional dominante que ha sido asociado con una disminución de la eficiencia transcripcional y una pobre respuesta terapéutica a los antidepresivos. (51)

El gen *SLC6A4* codifica a una proteína de membrana que transporta la serotonina de los espacios sinápticos a las neuronas presinápticas, dicha proteína termina la acción de la serotonina y la recicla a una forma dependiente de sodio. Esta proteína es el blanco de estimulantes psicomotores, como las anfetaminas y la cocaína, y de antidepresivos tricíclicos como la imipramina, además es un miembro de la familia de los

neurotransmisores con alta afinidad al sodio. El gen SLC6A4 abarca 31 kb y consta de 14 exones, localizado en el cromosoma 17q11.1-q12. (55).

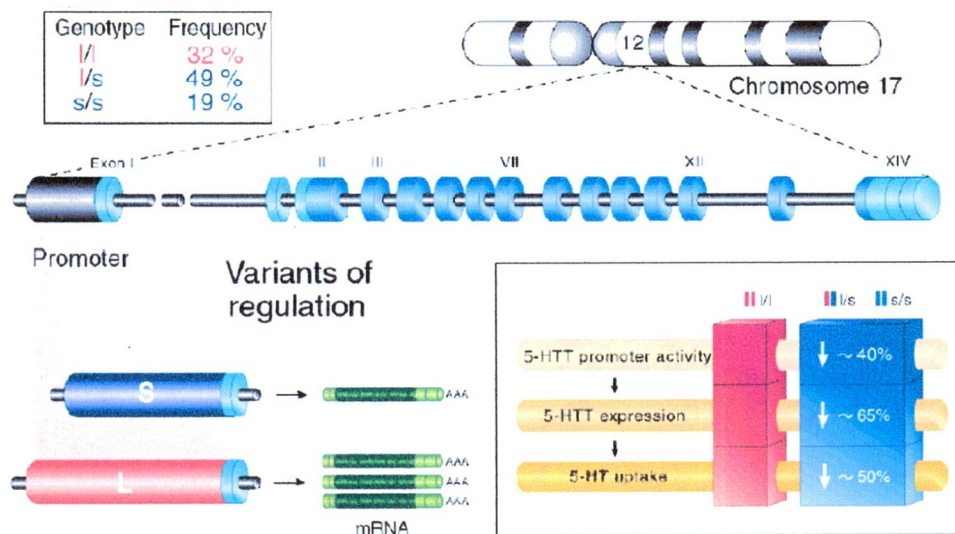


Fig. 3. Representación esquemática de los polimorfismos del promotor del transportador de serotonina, tomada de Lesh (1996).

Se ha encontrado un polimorfismo de repetidos de longitud variable en el promotor de este gen, que afecta la cantidad de recaptación de serotonina y se cree que está implicado en el síndrome muerte súbita, la conducta agresiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer y a la susceptibilidad a depresión en pacientes con trauma emocional. El análisis de la secuencia consenso del transportador de serotonina reveló un marco de lectura abierto (ORF) de 630-aminoácidos con 92% de identidad con el transportador de serotonina del ratón, y múltiples RNAm encontrados en placenta y pulmón humanos (54).

Se ha identificado un polimorfismo en la región promotora del gen SLC6A4, consiste en la inserción o deleción de 44 pb (alelo normal de 16 repetidos), involucrando de 6 a 8 elementos repetidos, las variaciones de dicha región de repetidos se conocen como alelo corto (s) y alelo largo (l) (56).

Se ha sugerido que la presencia de de 1 o 2 alelos (s) en un individuo, se asocia con síntomas depresivos, depresión probada y tendencia al suicidio ante eventos estresantes (57), y que dicho polimorfismo se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con depresión mayor que en individuos sanos (57, 58). También el alelo corto (s), ha sido asociado con una respuesta deficiente a la paroxetina (59). Mientras que el genotipo l/l de *SLC6A4* se encuentra relacionado con una mejor respuesta a la fluoxetina (60).

12. JUSTIFICACIÓN:

La esquizofrenia es una enfermedad del cerebro crónica, grave e incapacitante que afecta cerca del 1% de la población mundial y se refleja en un incremento en la mortalidad y una reducción de alrededor del 20% de la expectativa de vida de los sujetos afectados. Al no existir una causa única para la esquizofrenia, se ha concluido es consecuencia de varios efectos acumulativos de múltiples factores de riesgo.

Existen diferentes pacientes que responden o son no respondedores al tratamiento, ya que en muchas ocasiones algunos de ellos presentan efectos secundarios que los lleva a dejar el tratamiento. Se ha demostrado que la presencia de polimorfismos en algunos genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos principalmente en CYP2D6 y neurotransmisores, como en el transportador de serotonina, contribuyen a la incidencia de efectos adversos o falta de respuesta a los antidepresivos, por lo que es importante evaluar la posible correlación entre la presencia de las variantes alélicas *4 y *10 del gen cyp2d6 y la presencia del alelo corto (s) o largo (l) para el gen slc6a4 con la respuesta terapéutica al tratamiento con antipsicóticos en pacientes con esquizofrenia.

13. OBJETIVOS

Objetivo General

Correlacionar los polimorfismos cyp2d6*4 y cyp2d6*10, y el polimorfismo 5-HTTLPR del gen slc6a4, con la falta de respuesta terapéutica al tratamiento con antipsicóticos en pacientes con esquizofrenia.

Objetivos Particulares:

- Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina slc6a4.
- Obtener frecuencias alélicas y genotípicas para cyp2d6*4 y cyp2d6*10 en una muestra de pacientes con esquizofrenia.
- Correlacionar los genotipos obtenidos para cyp2d6 y slc6a4, con la respuesta terapéutica que presentan los pacientes con esquizofrenia.
- Correlacionar los genotipos obtenidos para cyp2d6 y slc6a4, con el género de los pacientes con esquizofrenia.
- Determinar si existe correlación entre el estado metabólico basado en el genotipo para las variantes alélicas del gen cyp2d6 y la respuesta terapéutica al tratamiento.

14. Diseño Metodológico

Tipo de Investigación

Observacional	(X)	Experimental	()
Longitudinal	(X)	Transversal	()
Prospectiva	(X)	Retrospectiva	(X)
Descriptiva	()	Comparativa	(X)
Abierta	(X)	A ciegas	()

Grupos de Estudio

Grupo problema. Pacientes con esquizofrenia de entre 35 y 60 años de ambos sexos, que fueron tratados con 20 mg de clorpromazina/ día.

Grupo testigo. El estudio no incluye grupo control (estudios previos realizados sobre estos polimorfismos servirán como grupos control) (1, 2).

Tamaño de la muestra. Se estudiarán 93 pacientes con esquizofrenia (Tipo de muestreo no probabilístico intencional, en base al objetivo del estudio y a los criterios de inclusión)

Criterios de inclusión.

- Sujetos diagnosticados con esquizofrenia de acuerdo a las escalas internacionales DSM-IV e ICD-10.
- Pacientes esquizofrénicos, que fueron tratados con 20 mg de clorpromazina.
- Tener entre 35 y 60 años de edad.
- Pacientes con esquizofrenia que aceptaron participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes con depresión.

- Pacientes con trastorno bipolar.
- Pacientes con otras alteraciones psiquiátricas.
- Pacientes con pruebas de función hepática alteradas.
- Pacientes con pruebas de función renal alteradas.
- Pacientes con hipoalbuminemia.
- Pacientes deprimidos que reciben tratamiento con antidepresivos como fluoxetina o paroxetina.
- Pacientes embarazadas.
- Pacientes con otras enfermedades crónico-degenerativas

Criterios de eliminación

Causas que obliguen a retirar al sujeto como elemento del estudio una vez que ha sido incluido en la investigación.

- Muestra sanguínea insuficiente y de mala calidad
- Pacientes que decidan no continuar con el estudio
- Pacientes que fallezcan durante el estudio

Metodología Experimental



Fig. 4. Representación de la metodología experimental seguida para el estudio de 93 pacientes diagnosticados con esquizofrenia mediante la ayuda del ICD-10 y DMS-IV que fue realizada por el Grupo Medico Carraci. A los pacientes que firmaron un consentimiento informado se les tomo 10 ml de sangre periférica, para la extracción de ADN y determinación de los polimorfismos en estudio, de acuerdo con el siguiente esquema.

15. Metodología Experimental

15.1 Extracción de ADN a partir de sangre.

Las muestras de ADN fueron proporcionadas por el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente”, el laboratorio proporcionó 20 μl de cada muestra con una concentración de ADN de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, para estandarizar los protocolos se requirió de extraer el ADN de 20 muestras de sangre utilizando el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega Corporation), cuyo protocolo se describe a continuación:

Procedimiento

El proceso de la extracción del ADN se llevó a cabo adicionando 900 μl de solución de lisis celular (Cell Lysis Solution) y 300 μl sangre con anticoagulante (EDTA) a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 ml. incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue agitada por inversión 2 a 3 veces durante el proceso de la incubación con la finalidad de lisar los glóbulos rojos, posteriormente se centrifugo a 16,000 x g durante 20 segundos a temperatura ambiente, después se eliminó tanto sobrenadante como fuera posible sin perturbar el botón celular. Se tomo en consideración el estado de la muestra sanguínea, ya que si la muestra fue refrigerada durante más de un día, era necesario repetir el lavado en dos ocasiones más con solución de lisis celular. Una vez que contamos con el paquete celular de leucocitos se procedió a adicionar 300 μl de una solución de lisis nuclear (Nuclei lysis solution), pipeteando la solución de 5 a 6 veces con el propósito de lisar los glóbulos blancos, la solución fue incubada a 37°C durante 15 minutos, una vez que no se observan agregados celulares en el tubo, se agrego 100 μl de solución de precipitación proteica (Protein Precipitation Solution) agitando en vortex durante 20 segundos, periodo en el cual empezamos a observar la presencia de pequeños agregados proteicos, nuevamente se centrifugo a 16,000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente,

al final de la centrifugación se observó un botón proteico de color café, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo de microcentrifuga que contenía 300 µl de isopropanol, la muestra se agitó por inversión hasta observar la formación de un entramado blanquecino que corresponde al ADN, el tubo fue centrifugado a 16,000 x g por 1 minuto y se decantó el sobrenadante para posteriormente adicionar 300 µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones, para posteriormente aspirar el sobrenadante y dejar secar el botón de ADN a temperatura ambiente durante 30 minutos, la rehidratación se llevó al cabo adicionando 100 µl de solución de rehidratación (Rehydration Solution) e incubando a 65°C durante una hora agitando constantemente en vortex, una vez terminado este paso nuestra muestra se encuentra lista para su cuantificación.

15.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación y determinación de la cantidad y calidad del ADN se realizó mediante espectrofotometría, tomando en consideración que el ADN presenta una relación entre su concentración y la absorbancia de la muestra determinada a una longitud de onda (λ) de 260 nm y tomando en consideración que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/µl de ADN, la concentración del ADN se determinó con la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN } \mu\text{g/ml}] = (A_{260\text{nm}}) (50) (\text{factor de dilución})$$

De la misma forma se determinó la pureza de las muestras midiendo la relación de absorbancia 260/280 nm, del resultado obtenido si es mayor a 1.8 el ADN se puede considerar como puro, de otra la muestra contendrá restos proteicos o de solventes utilizados en la extracción del ADN.

15.3 Identificación de los polimorfismos del 5-HTTLPR (Promotor del transportador de serotonina SLC6A4)

Para la amplificación del alelo corto (s) de 484 pb y largo (l) de 528 pb del promotor del gen *SLC6A4* se utilizaron los oligonucleótidos stpr5 y stpr3, los volúmenes y concentraciones de los reactivos para la PCR, así como las condiciones de la misma se muestra en los tablas siguientes.

Oligonucleótidos	secuencia
stpr3 (forward)	GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC
stpr5 (reverse)	GGCGTTGCCGCTCTGAATGC

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para la identificación de 5-HTTLPR

Reactivos	Volumen (μ L)	Concentración final
Agua estéril libre de nucleasas	9,4	
Amortiguador	1.5	(1.5 mmol/L MgCl ₂)
Enzima Taq Gold	0.2	(5u/ μ l)
dNTPs	1.5	(10 mmol/L)
Oligo stpr3	0.375	10 pmol
Oligo stpr5	0.375	10 pmol
ADN genómico	2.0	(aprox. 50 ng/ μ l)
DMSO	0.75	5%
Volumen total	15 μ l	

Tabla 8. Reactivos utilizados para la PCR del polimorfismo de región promotora de SLC6A4

Condición	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización	11 min	94
35 ciclos		
Desnaturalización	30 s	94
Alineamiento	30 s	62
Elongación	60 s	72
Extensión Final	7 min	72

Tabla 9. Condiciones de la PCR del polimorfismo de la región promotora de SLC6A4

En tubos estériles de 200 µl se agregó 1.5 µl de amortiguador de reacción 10X (1.5 mM MgCl₂), 10 picomoles de cada oligonucleótido (stpr3, stpr5) específicos para el promotor del gen slc6a4, 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.2 µl Taq DNA polimerasa (invitrogen) y Dimetil Sulfóxido (DMSO) al 5%, el volumen de la reacción se ajustó a 15 µl con agua estéril. Los tubos se incubaron en un termociclador (Thermoline) y se aplicó el programa de amplificación para 5-HTTLPR utilizando los siguientes parámetros de amplificación: la muestra se sometió a un ciclo de desnaturalización del ADN durante 5 min a 94°C., posteriormente se aplicaron 35 ciclos de polimerización, alineación y extensión que comprenden 30 s a 94°C; 30 s a 62°C y 35 s a 72°C; para finalmente dar un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C. Como control interno se amplificaron muestras previamente tipificadas en el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría "Juan Ramón de la Fuente" y como control negativo se utilizó la reacción sin la adición de ADN genómico. Los productos de amplificación de 5-HTTLPR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % utilizando como amortiguador TAE 1X y un marcador de peso molecular de 100 pb como patrón de referencia. Las muestras se corrieron a 80 V durante 1h/20min., posterior al corrimiento, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y los productos se visualizaron mediante su exposición a luz UV en un transiluminador (BioRad).

La reacción de PCR amplificó uno de los tres posibles genotipos que presenta el promotor del transportador de serotonina (s/s, s/l y/o l/l), (s) = short o alelo corto genera un amplicón de 484 pb y (l) large o alelo largo que genera uno de 528 pb. La cantidad de marcador de peso molecular cargado por poso fue de 1 µl equivalente a una concentración de 100 ng/µl, mientras que el ADN amplificado que se cargó por poso fue de 5 µl. En carril M podemos observar el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 1 y 4 se aprecia un amplicón de 428 pb que corresponde al genotipo homocigoto s/s para el promotor del transportador de serotonina (slc6a4), mientras que en los carriles 2 y 5 observamos un amplicón de 528 pb correspondiente al genotipo l/l de 5-HTTLPR, en el carril 3 observamos un genotipo heterocigoto con amplicones de 428 y 528 pb, por ultimo carril 6 corresponde al control positivo con un genotipo s/l que fue tipificada previamente por el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente”

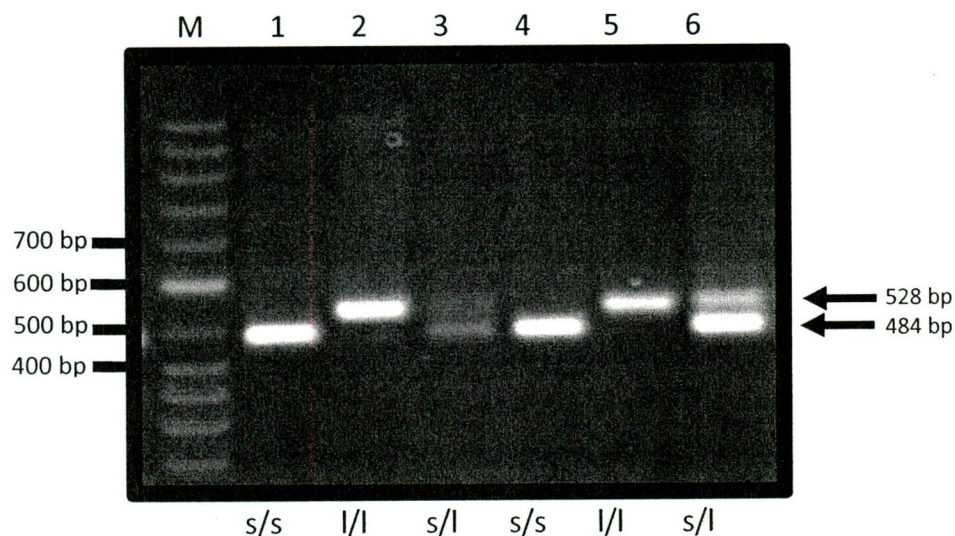


Figura 5. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de los amplicones generados de la amplificación específica del polimorfismo 5-HTTLPR que identifica uno los tres genotipos que pueden ser obtenidos.

15.4 Genotipificación de la variante alélica CYP2D6 *4

Para la amplificación de los posibles genotipos de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 se utilizaron los oligonucleótidos P9 y P10, los volúmenes y concentraciones de los reactivos para la PCR, así como las condiciones de la misma se muestra en los cuadros siguientes.

Oligonucleótidos	secuencia
P9	GCTTCGCCAACCACTCCG
P10	AAATCCTGCTCTTCCGAGGC

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de cyp2d6*4

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Agua estéril libre de nucleasas	14.2	
Amortiguador	2.0	(1X)
MgCl ₂	1.0	(1.5 mM)
Taq Polimerasa	0.2	(5U/ul)
DNTPs	0.6	(10 mmol/L)
Oligo p9	0.8	1 pmol
Oligo p10	0.8	1 pmol
DMSO	1.0	3%
ADN genómico	1.0	(aprox. 50 ng/ul)
Volumen total	20 µl	

Tabla 11. Reactivos utilizados para la PCR del polimorfismo de la región promotora de cyp2d6*4

Condición	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización	2	94
35 ciclos		
Desnaturalización	60 s	94
Alineamiento	60 s	63
Elongación	120 s	72
Extensión final		
Extensión final	7 min	72

Tabla 12. Condiciones de la PCR de CYP2D6*4

En tubos de estériles de 200 µl se agregó 2.0 µl de amortiguador de reacción 10X (1.5 mM/ MgCl₂), 1 picomol de cada oligonucleótido sentido (p9) y antisentido (p10) (Tabla 10.) específicos para amplificar la secuencia que contiene la variante alélica cyp2d6*4, 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.2 µl Taq DNA polimerasa (invitrogen) y dimetil sulfóxido (DMSO) al 3%, el volumen de la reacción se ajustó a 20 µl con agua estéril. Los tubos se incubaron en un termociclador (Thermoline) y se aplicó el programa para la amplificación de la secuencia que contiene la variante alélica cyp2d6*4 utilizando los siguientes parámetros de amplificación: la muestra se sometió a un ciclo de desnaturalización del ADN durante 5 min a 94°C. Posteriormente a 35 ciclos de polimerización, alineación y extensión que comprenden 60 s a 94°C; 60 s a 63°C y 120 s a 72°C; para finalmente dar un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C. Como control positivo se amplificaron muestras previamente tipificadas por el laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia y como control negativo se utilizó la reacción sin la adición de ADN genómico. Los amplicones generados de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0 % utilizando como amortiguador TAE 1X y un marcador de peso molecular de 100 pb como patrón de referencia. Las muestras se corrieron a 80 v durante 1h/20min., posterior al

corrimiento, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y los productos se visualizaron mediante su exposición a luz UV en un transiluminador (BioRad).

La cantidad de marcador de peso molecular cargado fue de 1 μ l equivalente a 100 ng/ μ l, mientras que el ADN amplificado que se cargó por pozo fue de 5 μ l. En el carril M podemos observar al marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 1, 2 y 3 se aprecia un amplicón de 334 pb que contiene la región mediante la cual identifica el polimorfismo de la variante alélica *cyp2d6*4*, en el carril 4 podemos observar el control positivo (muestra proporcionada por el laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia) y por ultimo en el carril 5, observamos al control negativo (todos los reactivos de la reacción sin la presencia de ADN genómico).

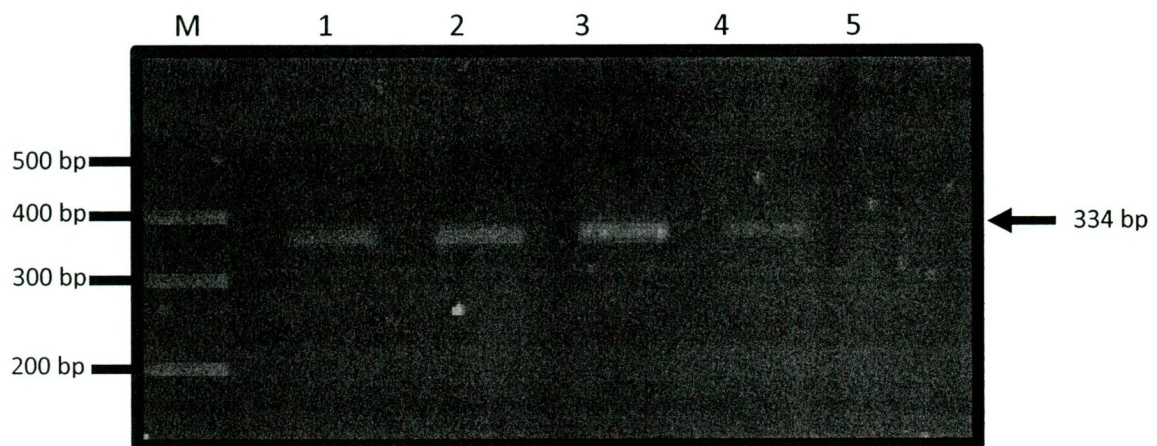


Figura 6. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % que muestra un amplicón de 334 pares de bases que puede contener la variante alélica *cyp2d6*4* del gen *cyp2d6* caracterizada con el cambio de una guanina por una adenina en la posición 1934 del gen.

15.4.1 Restricción enzimática del producto de PCR con *BstNI*

El amplicón de 334 pb fue sometido a una reacción de restricción con la enzima *BstNI* (endonucleasa del tipo II que reconoce la secuencia 5' GGWCC 3'). La digestión con *BstNI* se realizó de la siguiente forma: en un tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 ml. se adiciono 18 µl de agua estéril y desionizada, 2 µl de amortiguador de restricción y 10 µl de producto de PCR, la mezcla se incubo a 37°C durante 16 horas. Los fragmentos resultantes de la restricción fueron resueltos y analizados en geles de agarosa al 3% en TAE 1X y como patrón de referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb.

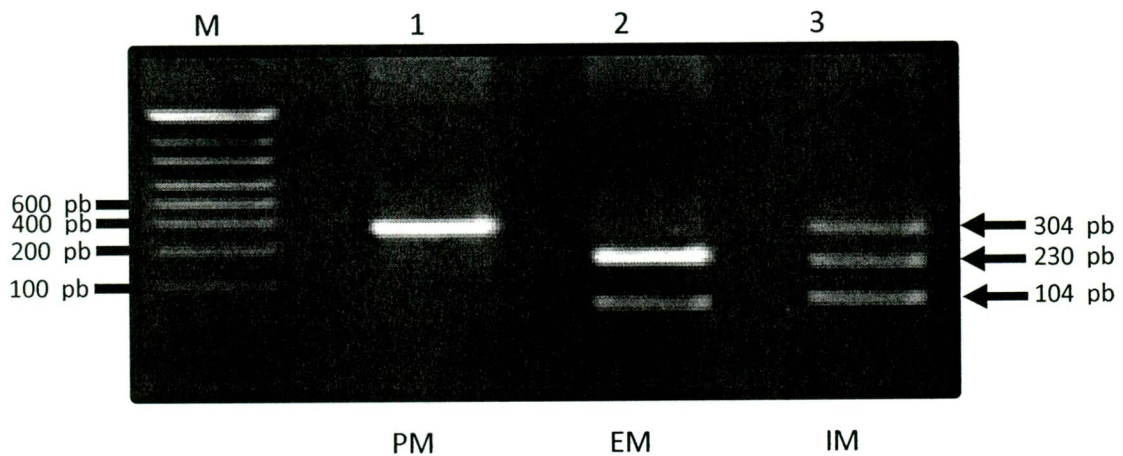


Fig. 7. Patrones de restricción para un amplicón de 334 pb que contiene la variante alélica *cyp2d6*4*.

La presencia de la variante alélica *cyp2d6*4* en un individuo resulta en una enzima sin actividad. En la línea M observamos el marcador de peso molecular de 100 pb, en la línea 1 observamos una muestra con genotipo **4/*4*, línea 2 la muestra con un genotipo **1/*1* y línea 3 una muestra con un genotipo **1/*4*.

Tres diferentes genotipos pueden ser obtenidos que se relacionan a tres estados metabólicos: metabolizador pobre (PM), metabolizador intermedio (IM) y metabolizador extensivo (EM). En el carril M observamos al marcador de peso molecular de 100 pb, en el carril 1 un producto de PCR de 334 pb resultado de la pérdida del sitio de restricción debido al cambio de una Guanina (G) por una Adenina (A) en la posición 1934; en el carril 2 observamos dos bandas (230 y 104 pb) que corresponden a un genotipo de metabolizador extensivo o normal, en los carriles 3 y 4 observamos tres amplicones de 334, 230 y 104 pb correspondiente al genotipo de metabolizador intermedio, o bien, la presencia de un alelo mutante (*cyp2d6*4*) y la presencia de un alelo normal, por último el carril 5 corresponde al control positivo (muestra con genotipo PM).

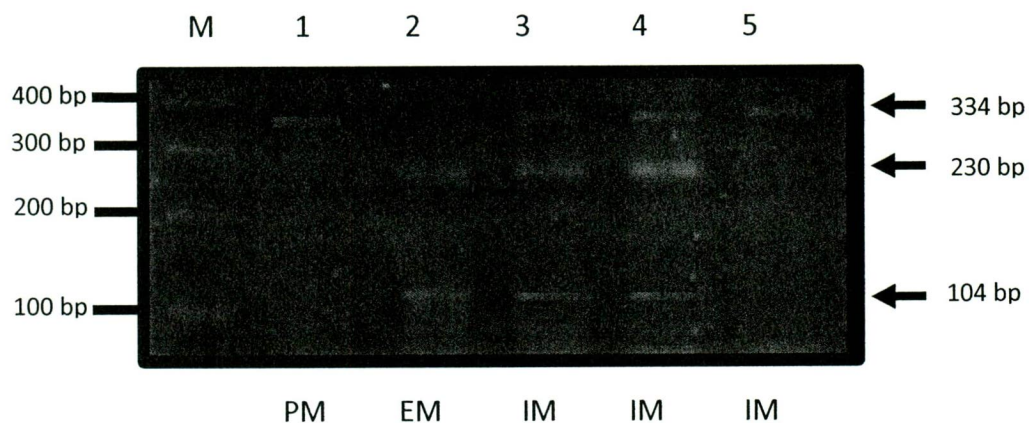


Figura 8. Electroforésis en geles de agarosa al 3 % que muestra los diferentes patrones de restricción de un amplicón de 334 pb que contiene la variante alélica *cyp2d6*4*, después de la digestión con la enzima *BstNI*, los patrones de restricción revelan tres genotipos diferentes al igual que establecen un estatus de metabolismo para el gen *cyp2d6*.

15.5 Genotipación de la variante alélica CYP2D6 *10

La presencia de esta variante alélica de la enzima CYP2D6 se caracteriza por el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 188, la identificación de esta variante alélica se realizó amplificando una secuencia flanqueada por los oligonucleótidos P11 (sentido) y P12 (antisentido), los volúmenes y concentraciones de los reactivos para la PCR, así como las condiciones de la misma se muestra en los cuadros siguientes.

Oligonucleótidos	secuencia
P11	TCAACACAGCAGGTCA
P12	CTGTGGTTTCACCCACC

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR de cyp2d6*10

Reactivos	Volumen (μ L)	Concentración final
Amortiguador	2.0	1X
MgCl ₂	1.0	1.5 mM
Enzima Taq Gold	0.2	(5u/ μ l)
DNTPs	0.6	(10 mmol/L)
Oligo P11	0.8	10 pmol
Oligo P12	0.8	10 pmol
DMSO	1.0	3%
ADN genómico	2.0	(aprox. 50 ng/ μ l)
H ₂ O estéril	11.2	
Volumen total	20 μ l	

Tabla 14. Reactivos utilizados para la PCR de la variante alélica cyp2d6*10

Condición	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización	11 min	94
35 ciclos		
Desnaturalización	30 s	94
Alineamiento	15 s	59
Elongación	60 s	72
Extensión final		
Extensión final	7 min	72

Tabla 15. Condiciones de PCR para *cyp2d6*10*

En tubos estériles de 200 µl se agregó 2.0 µl de amortiguador de reacción 10X (1.5 mM/L MgCl₂), 1 picomol de cada oligonucleótido en sentido (p11) y antisentido (p12) específicos que amplifican la secuencia que contiene la variante alélica *cyp2d6*10*, 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.2 µl Taq DNA polimerasa (invitrogen) y dimetil sulfóxido (DMSO) al 3%, el volumen de la reacción se ajustó a 20 µl con agua estéril. Los tubos se incubaron en un termociclador (Thermoline) y se aplicó el programa de amplificación para la variante alélica *cyp2d6*10* utilizando los siguientes parámetros de amplificación: la muestra se sometió a un ciclo de desnaturalización del ADN durante 5 min a 94°C. Posteriormente a 35 ciclos de polimerización, alineación y extensión que comprenden 30 s a 94°C; 15 s a 63°C y 60 s a 72°C; para finalmente dar un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C. Como control positivo se amplificaron muestras previamente tipificadas por el laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia y como control negativo se utilizó la reacción sin la adición de ADN genómico. Los productos de amplificación por PCR de *cyp2d6*10* se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0 % utilizando como amortiguador TAE 1X y un marcador de peso molecular de 100 pb como patrón de referencia. Las muestras se corrieron a 80 v durante 1h/20min., posterior al corrimiento, los geles fueron teñidos con

bromuro de etidio (10 mg/ml) y los productos se visualizaron mediante su exposición a luz UV en un transiluminador (BioRad).

La cantidad de marcador de peso molecular cargado fue de 1 μ l equivalente a 100 ng/ μ l, mientras que el ADN amplificado que se cargó por pozo fue de 5 μ l. En el carril M podemos observar al marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 1, 2 y 3 se aprecia un amplicón de 433 pb resultado de la amplificación de la región que contiene el polimorfismo de la variante alélica *cyp2d6*4*, en el carril 4 podemos observar la muestra del control positivo y por ultimo en el carril 5 observamos al control negativo, muestra que contiene todos los reactivos de la reacción sin la presencia de ADN genómico.

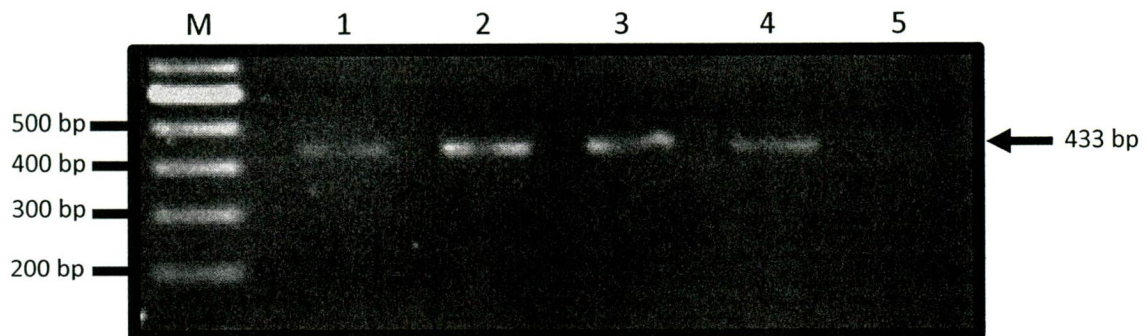


Figura 9. Electroforésis en geles de agarosa al 2 % que muestra la presencia de un amplicón de 433 pb de puede contener la variante alélica *cyp2d6*10* del gen *cyp2d6*, caracterizada con el cambio de una citosina por una timina en la posición 188 del gen.

15.5.1 Restricción enzimática del producto de PCR con *Hph I*

El amplicón de 433 pb fue sometido a una reacción de restricción con la enzima *Hph I* (endonucleasa del tipo II que reconoce la siguiente secuencia 5' GGTGA 3'(8/7)). La digestión con *Hph I* se realizó de la siguiente forma: en un tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 ml. se adicionó 18 µl de agua estéril y desionizada, 2 µl de amortiguador de restricción, 3 U de *Hph I* y 10 µl de producto de PCR, la mezcla se incubó a 37°C durante 16 horas. Los fragmentos resultados de la restricción fueron resueltos y analizados en geles de agarosa al 3% en TAE 1X. Como patrón de referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb.

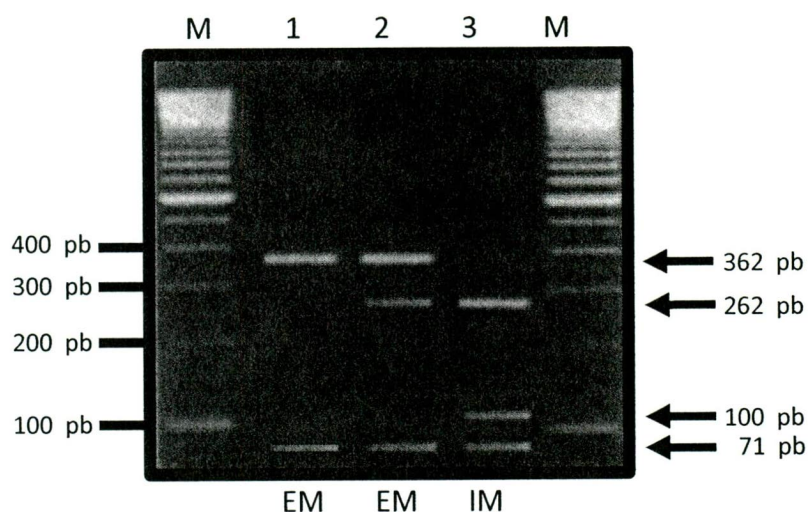


Fig. 10. Patrones de restricción para un amplicón de 433 pb que contiene la variante alélica *cyp2d6*10*.

En las líneas M observamos un marcador de peso molecular de 100 pb, en la línea 1 observamos una muestra con genotipo **1/*1* que corresponde a la wild type, en la línea 2 una muestra con un genotipo **1/*10* en donde uno de los alelos se encuentra afectado y línea 3 una muestra con un genotipo **10/*10* u homocigoto para la variante alélica *cyp2d6*10*.

La reacción de restricción genera tres genotipos que podemos clasificar de acuerdo a su estatus metabólico en: metabolizador intermedio (IM) y metabolizador extensivo. En el carril M observamos al marcador de peso molecular de 100 pb, en el carril 1 observamos un amplicón de 433 pb, no digerido por *HphI* considerado como control negativo de la reacción, en los carriles 2, 5 y 7 se observan dos amplicones de 362 y 71 pb que corresponden al genotipo *1/*1 (C/C) y fenotipo de metabolizador extensivo (EM) o wild type, en los carriles 3, 4 y 6 se presentan tres fragmentos de 262, 100 y 71 pb correspondiente al genotipo *1/*10 (C/T) y fenotipo de metabolizador extensivo (EM), por último en el carril 8 observamos al control positivo con el genotipo *10/*10 (T/T) y fenotipo de metabolizador intermedio (IM).

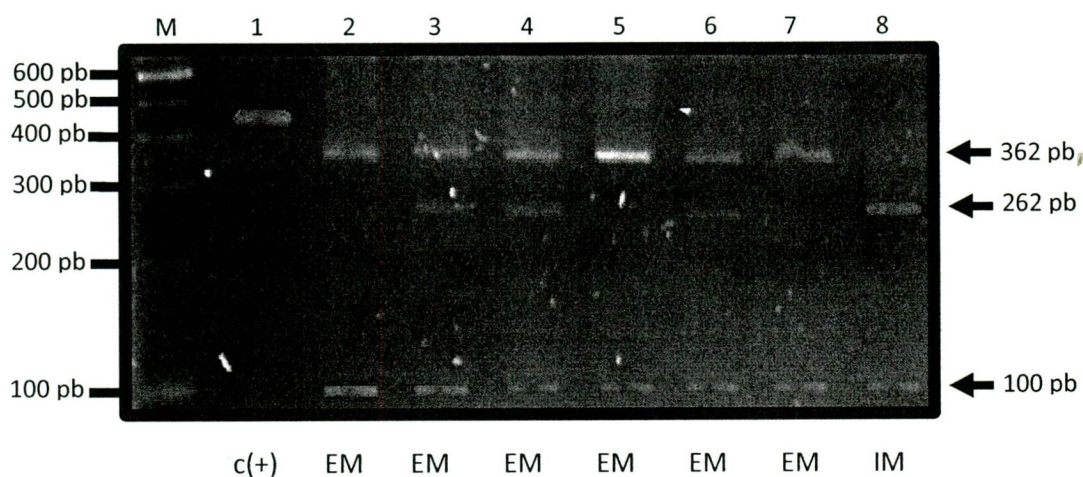


Figura 11. Electroforésis en geles de agarosa al 3 % que muestra los diferentes patrones de restricción después de la digestión con la enzima *HphI* de un amplicón de 433 pb, los patrones de restricción revelan tres genotipos al igual que establecen un estatus de metabolismo para el gen *cyp2d6*.

15.6 Confirmación de la secuencia de los polimorfismos

Con el objetivo de confirmar la identificación de las secuencias del promotor del transportador de serotonina y de las variantes alélicas *cyp2d6**4 y *cyp2d6**10 del gen *cyp2d6* se procedió a secuenciar algunas muestras de con genotipo homocigoto para los diferentes polimorfismos.

15.6.1 Purificación del producto de PCR.

Se tomaron 15 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 45 minutos, posterior al corrimiento, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y los productos resueltos se visualizaron mediante su exposición UV en donde fueron identificados para ser purificados mediante la ayuda del kit comercial "*QIAquick Gel Extraction Kit*" de QUIAGEN. Después de la purificación se tomaron 2 µl de producto de PCR purificado y se corrieron en un gel de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb del cual conocíamos su concentración, lo que nos permitió determinar la concentración de cada una de las muestras.

15.6.2 Marcaje con terminadores fluorescentes

Los fragmentos de PCR purificados fueron marcados por el método de terminadores fluorescentes empleando el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems de acuerdo a las indicaciones del manual) por lo tanto, procedimos a adicionar de 40 a 50 ng de producto de PCR a una mezcla que contenía 2 µl de mezcla de reacción (terminadores), 3 µl de amortiguador de reacción y 1 µl del oligonucleótido (3.2 pmol) en un volumen total de 20 µl, la reacción de secuenciación se llevo al cabo en un termociclador (Thermoline), utilizando las siguientes condiciones de ciclado 96°C 1 minuto, seguido de 25 ciclos 96°C 10 seg., 50°C 5 seg y 60°C 4 min., una vez concluido el termociclado los productos fueron

purificados con el kit comercial DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del manual.

15.6.3 Secuenciación.

La secuenciación fue llevada a cabo en el Laboratorio No. 1 de del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, con la ayuda de un secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar que separa los fragmentos marcados con diferentes fluorocromos dependiendo de su tamaño, migrando primero aquellos de menor peso molecular para después migrar aquellos con un mayor peso, una vez que estos pasan a través del detector, los fluorocromos son excitados mediante la ayuda de un laser de Argón, la emisión de energía resultante es captada por un filtro que traduce la señal en lo que se conoce con el nombre de electroferograma. Cada fragmento fue secuenciado tanto la región sentido como antisentido con la finalidad de corroborar la secuencia obtenida.

Polimorfismo del promotor del transportador de serotonina

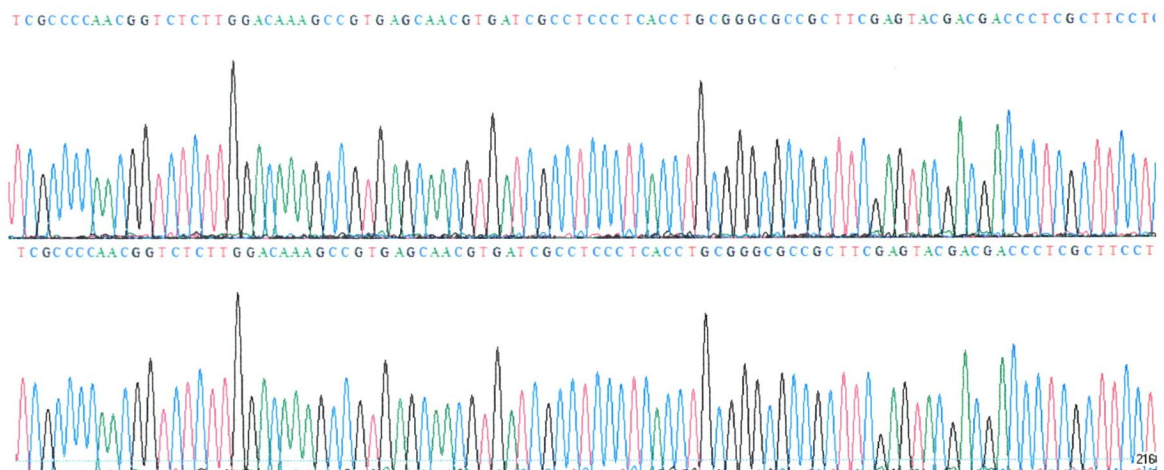


Fig. 12. Resultados de la comparación de secuencias entre dos amplicones de 484 pb correspondientes al alelo corto (s) del polimorfismo encontrado en el promotor del transportador de serotonina (slc6a4).

Confirmación del polimorfismo de la variante alélica *cyp2d6*4*

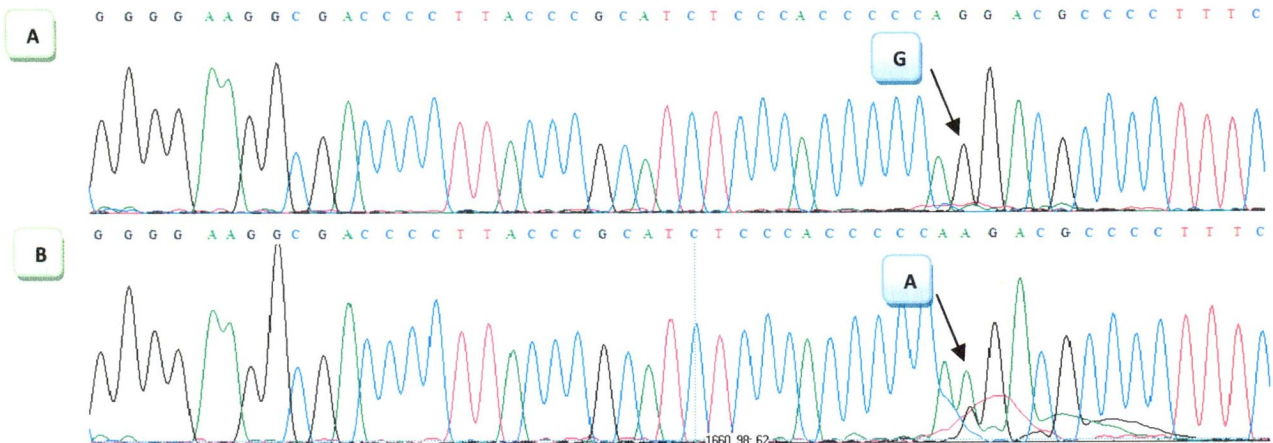


Fig. 13. En la figura A se muestra la presencia de una timina (G), mientras que en la figura B podemos observar la presencia de una citosina (A), el cambio de G por A en la posición 1934 origina la variante *cyp2d6*4* que codifica para una proteína trunca sin actividad.

Confirmación del polimorfismo de la variante alélica *cyp2d6*4*

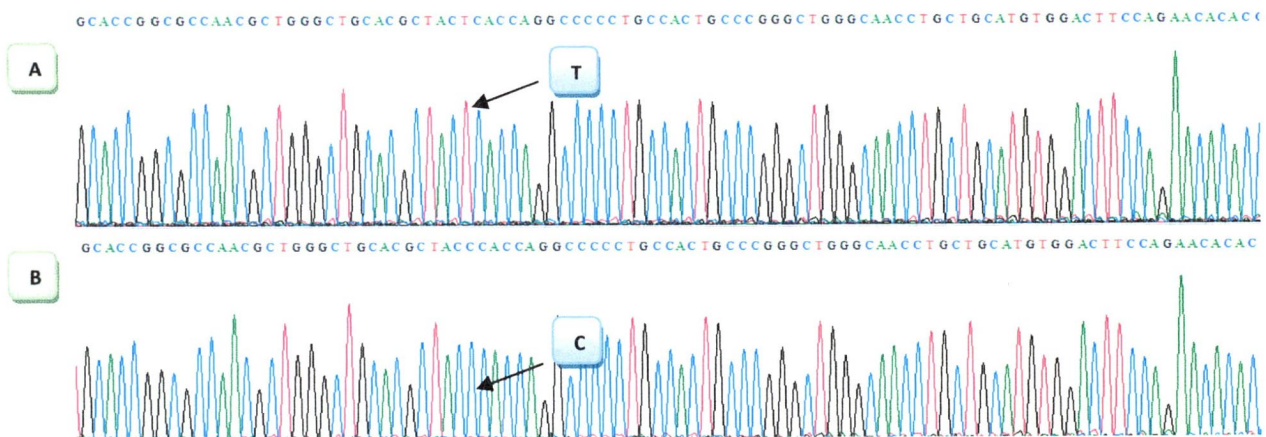


Fig. 14. En la figura A se muestra la presencia de una timina (T), mientras que en la figura B podemos observar la presencia de una citosina (C), el cambio de la C por T en la posición 188 del gen *cyp2d6* origina la variante alélica *cyp2d6*10* que codifica para una proteína con actividad disminuida.

Una vez secuenciadas las muestras se realizó un alineamiento en Clustal W utilizando el programa Bioedit 7.0.8 verificado la identidad de las secuencias entre dos muestras que presentaban el alelo corto (s) para 5-HTTLPR, y la forma nativa y la mutación para el caso de las variantes alélicas *cyp2d6*4* y *cyp2d6*10*.

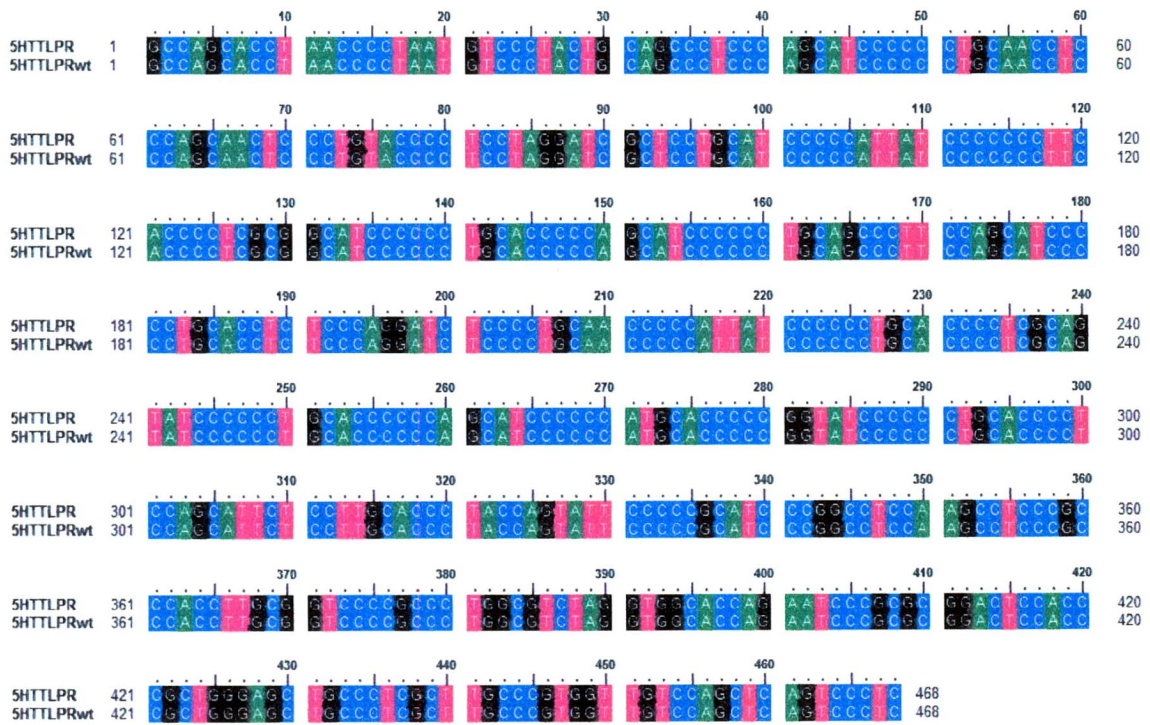


Fig. 15. Alineamiento en Clustal W de una muestra homocigota con el genotipo s/s para el polimorfismo del transportador de serotonina, alineado con la wild type.

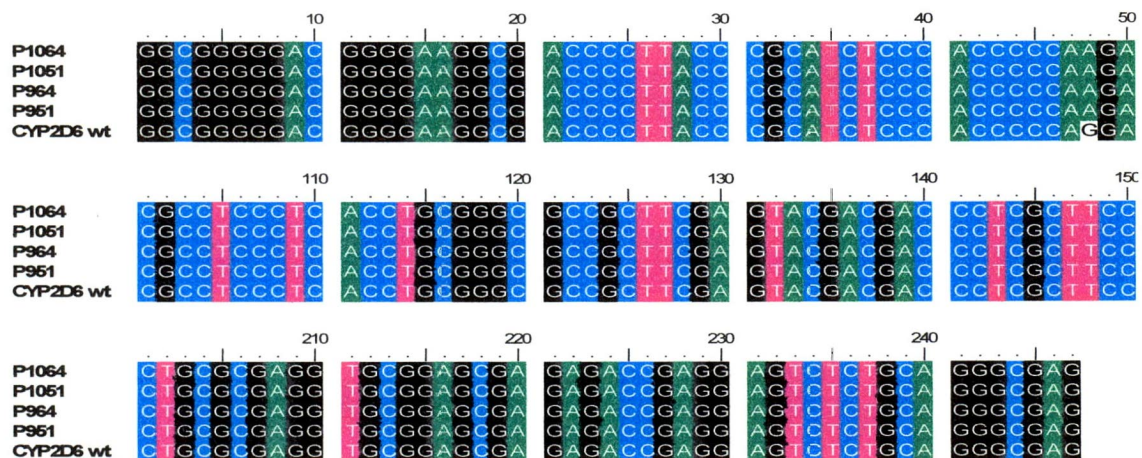


Fig. 16. Alineamiento en Clustal W de la secuenciación de muestras homocigotas para el genotipo $*4/*4$ (P1064, P1051, P964 y P951) del gen *cyp2d6* con una muestra que presenta el genotipo $*1/*1$ (CYP2D6 wt), en donde puede observar el cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 1934 del gen *cyp2d6*.

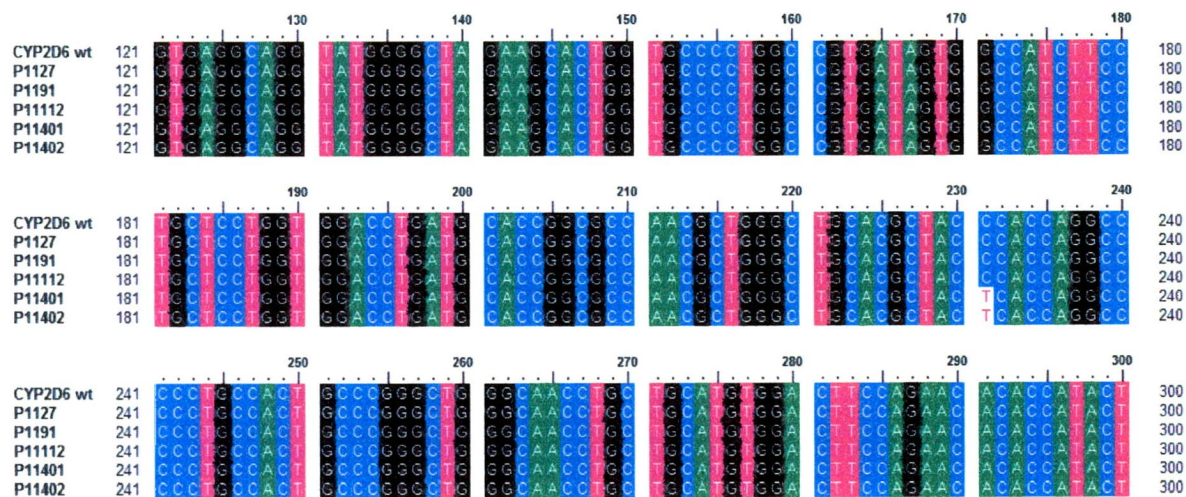


Fig. 17. Alineamiento en Clustal W de la secuenciación de muestras homocigotas para el genotipo $*10/*10$ (P11401 y P11402) del gen *cyp2d6* con una muestra que presenta el genotipo $*1/*1$ (CYP2D6 wt, P1127, P1191 y P11112), en donde puede observar el cambio de una Citosina por una Timina en la posición 188 del gen *cyp2d6*.

16. RESULTADOS

En este estudio se analizó un total de 93 muestras, las cuales presentan un número de identificación (ID) que sirve como base para la asignación de los resultados obtenidos en cada uno de los polimorfismos estudiados (5-HTTLPR, cyp2d6*4 y cyp2d6*10).

Como se mencionó en el diseño metodológico se trata de estudio retrospectivo y ciego en donde los datos del género y respuesta terapéutica al tratamiento (Tabla 16) fueron proporcionados una vez completada la genotipificación, evitando con esto una predisposición a los resultados, los datos fueron proporcionados por el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente” y el Grupo Médico Carraci, una vez que contamos con toda la información se procedió a su agrupación y análisis.

Tipo de respuesta al tratamiento con clorpromazina	% de Individuos
Respondieron	32.25%
Respuesta Parcial	25.80%
No hubo respuesta	32.25%

Tabla 16. Porcentaje de pacientes con esquizofrenia que respondieron, respondieron parcialmente y que no respondieron al tratamiento con clorpromazina.

Es importante considerar el hecho de 32.25% no respondieron al tratamiento y 25.80% no respondieron inicialmente, lo que lleva a los pacientes a abandonar no solo el tratamiento sino las terapias, lo que en algunas ocasiones puede tener consecuencias muy serias.

De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Enfermedades Mentales (NIMH) la esquizofrenia es un padecimiento que afecta a hombres y mujeres en la misma proporción por lo que resulta interesante conocer si la respuesta terapéutica en cada uno de estos grupos varía de acuerdo al género, de igual forma, los datos fueron proporcionados por el Grupo Médico Carraci, en la gráfica se puede observar una preponderancia del sexo masculino (52 hombres y 33 mujeres) entre los pacientes con esquizofrenia en el presente estudio, cabe resaltar que existen 8 muestras de las cuales no fueron proporcionados datos de respuesta y sexo.

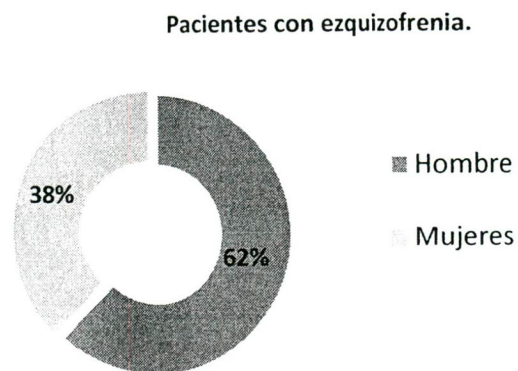


Gráfico 1. Porcentaje de pacientes con esquizofrenia agrupados por género.

La agrupación de los pacientes por género nos muestra que existe una mayor proporción de sujetos masculinos con respecto a las mujeres en el grupo de pacientes con esquizofrenia.

16.1 Polimorfismo 5-HTTLPR del gen slc6a4

En nuestro estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con esquizofrenia para el polimorfismo 5-HTTLPR, con el objetivo de determinar si la presencia de alguno de estos alelos y/o genotipos puede establecer una correlación ya sea con la esquizofrenia, o bien, con la falta de respuesta al tratamiento con clorpromazina.

El promotor del transportador de serotonina (slc6a4) contiene un polimorfismo conocido como 5-HTTLPR, que presenta la inserción o delección de un fragmento de 44 pb, generando tres posibles genotipos: s/s, s/l y l/l con amplicones de 484/484, 484/528 y 528/528 pb respectivamente.

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	s/s	s/l	l/l	Alelo (s)
5-HTTLPR	23.66%	44.09%	32.26%	45.70%

Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina (slc6a4) en pacientes con esquizofrenia.

Lo que observamos en los resultados es una mayor frecuencia del genotipo heterocigoto (s/l), mientras que el alelo (s) es el más frecuente en el grupo de pacientes con esquizofrenia genotipificado en este estudio (**Gráficos 2 y 3**).

Posteriormente, se comparo las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina (slc6a4) entre un grupo control (2) y el grupo de pacientes con esquizofrenia genotificado, para realizar el análisis se utilizó una herramienta estadística dispuesta en la internet por la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (http://e-stadistica.bio.ucm.es/mod_tablas/tablas_applet_ghost.html), la que permitió calcular el valor de χ^2 de Pearson a través de tablas de contingencia, así como el valor de p , con la finalidad de conocer si existen diferencias entre los casos y los controles, los resultados se muestran a continuación:

**Frecuencias alélicas y genotípicas para 5-HTTLPR
Casos vs. Controles**

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	s/s	s/l	l/l	Alelo (s)
Casos	23.66%	44.09%	32.26%	45.70%
Controles ¹	28.68%	47.06%	24.26%	52.26%

1. Camarena, et. al (2001)

Tabla 18. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina (slc6a4) de pacientes con esquizofrenia con un grupo control tipificados en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (2).

Como se puede observar en la tabla las frecuencias genotípicas entre casos y controles son muy similares lo cual puede observar en los **Gráficos 4 y 5**, en ambos casos el genotipo (s/l) es el más frecuente de la misma forma que el alelo (s) tiene una mayor presencia en ambos grupos.

La prueba de χ^2 fue calculada para probar la significancia de la asociación entre casos y controles utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas para el polimorfismo 5-HTTLPR

A

**Prueba de χ^2 para frecuencias alélicas de 5-HTTLPR
Casos vs. Controles.**

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	1	1.8824	0.170056

B

**Prueba de χ^2 para frecuencias genotípicas de 5-HTTLPR
Casos vs. Controles.**

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	2	1.9118	0.3845

Tabla 19. Resultados obtenidos de la prueba de χ^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

En nuestra de población de estudio se observa que las frecuencias alélicas y genotípicas son similares a las determinadas para un grupo control de individuos sanos ($p=0.170056$ y $p=0.3845$ respectivamente), *los resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre las frecuencias del grupo control con las encontradas para los pacientes con esquizofrenia.*

Genotipos para el polimorfismo 5-HTTLPR del gen slc6a4 correlacionados con el género.

Tomando en consideración datos sobre el género de los pacientes con esquizofrenia, se relaciono el genotipo obtenido para el polimorfismo 5-HTTLPR con el sexo de los sujetos.

Los sujetos del estudio fueron agrupados por género y de acuerdo al genotipo que presentaban para el promotor del transportador de serotonina (s/s, s/l, l/l). Se calculo la X^2 para conocer la significancia de asociación, utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$. para conocer la posible asociación entre el género vs. genotipo.

A

Frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por género.

Genotipos para 5-HTTLPR vs Genero			
Individuos	s/s	s/l	l/l
Hombre	19.23%	48.08%	32.69%
Mujeres	30.30%	39.39%	30.30%

B

Prueba de X^2 para frecuencias genotípicas de 5-HTTLPR Genotipo vs. Género

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	2	1.4286	0.4895

Tabla 20. Frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Los resultados muestran que no existe diferencia significativa ($p = 0.4895$) entre el genotipo para 5-HTTLPR y el género de los pacientes (**Gráfico 6**).

Genotipos para 5-HTTLPR del gen slc6a4 correlacionados con la respuesta terapéutica.

Los genotipos obtenidos para el polimorfismo 5-HTTLPR fueron comparados con la respuesta terapéutica al tratamiento. Es necesario mencionar que no fueron proporcionados los datos de respuesta de 8 pacientes con esquizofrenia, los cuales son descritos en la tabla como (Sin datos de respuesta). Se calculó la χ^2 utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$, comparando las frecuencias genotípicas de 5-HTTLPR con los diferentes grupos de respuesta terapéutica.

Frecuencias genotípicas para 5-HTTLPR agrupadas por respuesta.				
Genotipos para 5-HTTLPR vs Respuesta				
Individuos	s/s	s/l	l/l	Total
Responde	16.67%	50.00%	33.33%	30
R. parcial	33.33%	37.50%	29.17%	24
Sin respuesta	22.58%	45.16%	32.26%	31
Sin datos de resp.	25.00%	50.00%	25.00%	8
Total				93

Prueba de χ^2 para frecuencias genotípicas 5-HTTLPR Genotipo vs. Respuesta			
Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	4	2.1376	0.7105

Tabla 21. Frecuencias genotípicas agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y el datos fueron comparados con de la prueba de χ^2 (B).

Lo que podemos observar en las tablas es que no existen significancia de asociación ($p=0.7105$) entre los genotipos s/s, s/l y/o l/l y la respuesta al tratamiento (**Gráfico 7**).

16.2 Polimorfismos de la variante alélica cyp2d6*4

La importancia de la actividad de CYP2D6 en la eficacia terapéutica y los efectos adversos a los medicamentos que pueden presentarse durante el tratamiento, radica en que la genotipificación de aquellas variantes alélicas, sobre todo aquellas que producen mutaciones inactivantes o bien reducen la actividad de CYP2D6, podrían predecir un tratamiento farmacológico optimizado. El en caso de variante alélica cyp2d6*4 presenta una mutación en sitio de splicing que genera una proteína trunca sin actividad, originado por el cambio de una Guanina por una Adenina en la posición 1934, este polimorfismo puede presentar tres genotipos diferentes que pueden ser: genotipo *1/*1 (G/G) que corresponde a la forma nativa con actividad normal y un fenotipo de metabolizador extensivo (EM), genotipo *1/*4 (G/A) donde uno de los alelos está afectado presentando un fenotipo de metabolizador intermedio (IM), y el genotipo *4/*4 (A/A) en donde ambos alelos se encuentran afectados y el fenotipo corresponde a un metabolizador pobre (PM).

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	*1/*1 EM	*1/*4 IM	*4/*4 PM	Alelo *4
CYP2D6*4	78.49%	17.20%	4.30%	12.90%

Tabla 22. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Los resultados muestran es una mayor frecuencia del genotipo heterocigoto (*1/*1), mientras que el alelo (*1) es el más frecuente (**Gráficos 8 y 9**).

Para comparar las frecuencias genotípicas de la variante alélica *cyp2d6*4* entre el grupo control (2) y los pacientes con esquizofrenia se realizó la prueba de X^2 utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$, se utilizó como herramienta estadística dispuesta en internet por la UCM (http://e-stadistica.bio.ucm.es/mod_tablas/tablas_applet_ghost.html), con la finalidad de conocer si existen diferencias entre los casos y los controles.

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	*1/*1	*1/*4	*4/*4	Alelo *4
Casos	78.49%	17.20%	4.30%	12.90%
Controles ²	67.82%	29.89%	2.30%	11.52%

1. Camarena, et. al (2001) 2. M. Lopez, et. a. (2005)

Tabla 23. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica *cyp2d6*4* de pacientes esquizofrénicos con un grupo control tipificado en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (1).

Los resultados muestran que la forma nativa de la enzima CYP2D6 prevalece mas tanto en el grupo control como en el pacientes con esquizofrenia genotipo (*1/*1), de igual forma la frecuencia de personas en ambos grupo guarda una relación muy estrecha con un porcentaje de $\approx 12.0\%$ (**Grafico 10 y 11**).

Conociendo las frecuencias de ambos grupos se calculo la χ^2 a través de tablas de contingencia RxC, utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$, con la finalidad de establecer la significancia de asociación entre casos (pacientes con esquizofrenia) y controles (individuos sanos). Los cálculos señalan que tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas no presentan correlación entre casos y controles.

A

**Prueba de χ^2 para frecuencias alélicas cyp2d6*4
Casos vs. Controles.**

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	1	0.2445	0.620991

B

**Prueba de χ^2 para frecuencias genotípicas cyp2d6*4
Casos vs. Controles.**

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	2	4.3373	0.1143

Tabla 24. Resultados obtenidos de la prueba de χ^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) de cyp2d6*4 del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

El resultado ($p=0.11$) no muestra una diferencias significativa entre la población control y la del grupo de pacientes con esquizofrenia genotipificados en el presente estudio.

Genotipos para la variante alélica cyp2d6*4 correlacionados con el género.

Los datos del género de los pacientes fueron proporcionados por el Grupo Medico Carraci, 8 muestran tipificadas no aportaban este dato. Con la finalidad de correlacionar el genotipo para cyp2d6*4 con el género, se calculo la X^2 comparando los genotipos *1/*1, *1/*4 y/o *4/*4 con el género.

A

Genotipos para cyp2d6*4 correlacionados con el género

Genotipo vs. genero				
Individuos	*1/*1	*1/*4	*4/*4	Total
Hombre	80.77%	17.31%	1.92%	52
Mujeres	75.76%	18.18%	6.06%	33
Indeterminados	75.00%	12.50%	12.50%	8
Total				93

B

Prueba de X^2 para frecuencias genotípicas de cyp2d6*4 Genotipo vs. Género

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	2	1.0523	0.5909

Tabla 25. Frecuencias genotípicas para cyp2d6*4 agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Los resultados muestran que la prueba de X^2 obtenida rinde un valor de $p= 0.5909$ indicando que no existe una relación entre el género y el genotipo obtenido para esta variante alélica (**Gráfico 12**).

Genotipos de la variante alélica cyp2d6*4 correlacionados con la respuesta terapéutica.

Con los datos de respuesta terapéutica que mostraron los pacientes con esquizofrenia se calculo la χ^2 utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$, comparando las frecuencias genotípicas para cyp2d6*4 con los grupos de respuesta al tratamiento,

A

Genotipos para cyp2d6*4 correlacionados con la respuesta terapéutica

Genotipo vs respuesta				
Individuos	*1/*1	*1/*4	*4/*4	Total
Responde	66.67%	30.00%	3.33%	30
Respuesta parcial	79.17%	16.67%	4.17%	24
No responde	90.32%	6.45%	3.23%	31
Sin datos de resp.	62.50%	6.45%	3.23%	8
Total				93

B

Prueba de χ^2 para frecuencias genotípicas de cyp2d6*4 Genotipo vs. Respuesta

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	4	5.9308	0.2044

Tabla 26. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*4 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de χ^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Los resultados muestran que no existen significancia de asociación ($p = 0.2044$) entre los genotipos *1/*1, *1/*4 y/o *4/*4 y la respuesta al tratamiento (**Gráfico 13**).

16.3 Polimorfismos de la variante alélica cyp2d6*10

En el caso de la variante alélica cyp2d6*10 una mutación de una citosina (C) por una timina (T) en el gen cyp2d6 en la posición 188 propicia la formación de una proteína cuya actividad se ve disminuida, la genotipificación de esta variante alélica puede presentar tres genotipos: genotipo *1/*1 (C/C) que corresponde a la forma nativa con actividad normal y un fenotipo de metabolizador extensivo (EM), genotipo *1/*10 (C/T) donde uno de los alelos está afectado presentando un fenotipo de metabolizador intermedio (IM), y el genotipo *10/*10 (T/T) en donde ambos alelos se encuentran afectados y el fenotipo corresponde a un metabolizador intermedio (IM).

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	*1/*1	*1/*10	*10/*10	Alelo *10
CYP2D6*10	75.90%	18.99%	5.06%	14.20%

Tabla 27. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

Los resultados permiten observar en el grupo de pacientes con esquizofrenia una mayor frecuencia del genotipo (*1/*1), mientras que el alelo (*10) se presenta en un 14.20% (Gráficos 14 y 15).

Para comparar las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 entre el grupo control (2) y los pacientes con esquizofrenia se realizó la prueba de X^2 utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$, se utilizó como herramienta estadística dispuesta en internet por la UCM (http://e-estadistica.bio.ucm.es/mod_tablas/tablas_applet_ghost.html), con la finalidad de conocer si existen diferencias entre los casos y los controles.

Polimorfismo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica
	*1/*1	*1/*10	*10/*10	Alelo *10
Casos	75.95%	18.99%	5.06%	14.20%
Controles ¹	67.05%	30.68%	2.27%	12.96%

1. M. Lopez, et. a. (2005)

Tabla 28. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para la variantes alélica cyp2d6*10 de pacientes esquizofrénicos con un grupo control tipificado en una población de individuos sanos de origen mestizo mexicano (1).

Como se puede observar en ambos grupos el genotipo (*1/*1) es el más frecuente y se encuentra asociado con un estado de metabolizador extensivo, mientras que la variante alélica cyp2d6*10 se presenta en no más del 15% tanto en el grupo control como en el pacientes con esquizofrenia que fue sometido a genotipificación en este estudio (**Gráficos 16 y 17**).

Los resultados de la prueba de χ^2 utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$ fue calculada con la finalidad de establecer la significancia de asociación entre casos y controles. Las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas para *cyp2d6*10* en pacientes con esquizofrenia tipificadas son muy parecidas a las determinadas para un grupo control de individuos sanos (1).

A Prueba de χ^2 para frecuencias alélicas *cyp2d6*10*
Casos vs. Controles

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	1	0.043	0.835699

B Prueba de χ^2 para frecuencias genotípicas *cyp2d6*10*
Casos vs. Controles

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Pearson	2	5.6532	0.0592

Tabla 29. Resultados obtenidos de la prueba de χ^2 en la comparación entre las frecuencias alélicas (A) y genotípicas (B) de *cyp2d6*10* del un grupo control con el grupo de pacientes con esquizofrenia que se genotípico en este estudio.

Los resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre las frecuencias del grupo control con las encontradas para los pacientes con esquizofrenia, lo que demostró con un valor de $p = 0.835699$ para las frecuencias alélicas y de $p = 0.0592$ para las genotípicas.

Genotipos para la variante alélica cyp2d6*10 correlacionados con el género.

Los datos del género de los pacientes fueron proporcionados por el Grupo Medico Carraci, 8 muestran tipificadas no aportaban este dato. Con la finalidad de correlacionar el genotipo para cyp2d6*10 con el género, se calculo la X^2 comparando los genotipos *1/*1, *1/*10 y/o *10/*10 con el género de los pacientes.

Genotipos cyp2d6*10 vs. genero				
Individuos	*1/*1	*1/*10	*10/*10	Total
Hombre	79.57%	16.13%	3.85%	52
Mujeres	78.79%	15.15%	6.06%	33
Indeterminados	75.00%	25.00%	0.00%	8
Total				93

Prueba de X^2 para frecuencias genotípicas de cyp2d6*10 Genotipo vs. Género.			
Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	2	0.221	0.8954

Tabla 30. Frecuencias genotípicas para cyp2d6*10 agrupadas por género (A) y resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. género.

Los resultados muestran que la prueba de X^2 obtenida rinde un valor de $p= 0.4895$ indicando que no existe una relación entre el género y el genotipo obtenido para esta variante alélica (**Gráfico 18**).

Genotipos de la variante alélica cyp2d6*10 correlacionados con la respuesta terapéutica.

Los datos de la respuesta terapéutica que mostraron los pacientes con esquizofrenia fueron proporcionados por el Grupo Medico Carraci.

A

Genotipos cyp2d6*10 vs respuesta				
Individuos	*1/*1	*1/*10	*10/*10	Total
Responde	76.67%	16.67%	6.67%	30
Respuestas parcial	79.17%	20.83%	0.00%	24
Sin respuesta	83.87%	9.68%	6.45%	31
Sin datos de resp.	75.00%	25.00%	0.00%	8
Total				93

B

Prueba de X^2 para frecuencias genotípicas de cyp2d6*10

Genotipo vs. Respuesta

Chi-cuadrado	GL	Valor	p-valor
Sin corrección	4	2.835	0.5858

Tabla 31. Frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*10 que fueron agrupadas por respuesta al tratamiento (A) y los resultados de la prueba de X^2 (B) comparando genotipo vs. respuesta.

Los resultados muestran que no existen significancia de asociación ($p = 0.2044$) entre los genotipos *1/*1, *1/*10 y/o *10/*10 y la respuesta al tratamiento (**Gráfico 19**).

16.4 Establecimiento del estado metabólico con base en el genotipo obtenidos para las variantes alélicas, cyp2d6*4 y cyp2d6*10.

Una vez genotificados las variantes alélicas para cyp2d6*4 y cyp2d6*10 se agruparon de acuerdo al estado metabólico que les confiere dicho genotipo obteniendo los siguientes resultados.

A	Estatus Metabolizador	cyp2d6 *4	cyp2d6*10
	EM	73	89
	IM	16	4
	PM	4	0
	Total	93	93

B	Estatus Metabolizador	CYP2D6 *4	CYP2D6*10
	EM	78.49%	95.70%
	IM	17.20%	4.30%
	PM	4.30%	0.00%
	Total	100.00%	100.00%

Tabla 32. Descripción del estatus metabólico dependiente del genotipo obtenido en cada en los polimorfismos cyp2d6*4 y cyp2d6*10. A. Número de individuos identificados con un fenotipo particular y B. Porcentaje de individuos clasificados por estatus metabólico.

Los resultados muestran que un gran porcentaje de los pacientes con esquizofrenia presentan un genotipo que los relaciona con un fenotipo de metabolizador extensivo, mientras que solo el 4.30% pacientes presentan un fenotipo PM que pudiera asociarse con un deficiente metabolismo de los fármacos.

17. DISCUSION DE RESULTADOS

La esquizofrenia es una enfermedad crónica y en muchos casos discapacitante, cuyo tratamiento se basa en aminorar los síntomas de la enfermedad, por lo que es de suma importancia conocer los procesos biológicos involucrados con la enfermedad, tomando en consideración que la calidad de vida de los pacientes con esquizofrenia depende de la remisión, o bien, el control de los síntomas es importante, conocer las bases biológicas que intervienen en el metabolismo y sitio de acción de los fármacos utilizados en su tratamiento y generalmente conocidos como antipsicóticos. El propósito de nuestro estudio fue el de analizar los polimorfismos del promotor del transportador de serotonina que interviene en la regulación de la actividad del neurotransmisor conocido como serotonina y de los polimorfismos del gen CYP2D6 específicamente las variantes alélicas *cyp2d6*4* y *cyp2d6*10* que codifican para enzimas con actividad nula y disminuida respectivamente y que se encuentran relacionadas con un inadecuado metabolismo de los fármacos.

Para cumplir con los objetivos, los pacientes de estudio fueron agrupados por género y posteriormente por el tipo de respuesta al tratamiento con clorpromazina. En los pacientes con esquizofrenia podemos observar una mayor preponderancia del sexo masculino (62%) con respecto a la femenino (38%), y con respecto a la respuesta terapéutica se observó que existen proporciones similares en cada uno de los grupos, sin embargo, un dato importante es el hecho de que el 30% de los pacientes no responden, o bien, presentan una respuesta parcial (24%). En estos dos grupos, podemos basar el objetivo de nuestro estudio, que se dirige a establecer una posible correlación entre la falta de respuesta terapéutica al tratamiento con la presencia de alguno de los polimorfismos analizados en este estudio.

Polimorfismo del promotor del transportador de serotonina.

Una vez concluido el análisis preliminar que contemplo la agrupación de los pacientes en diferentes categorías se procedió a obtener los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas. Los resultados de la genotipificación para el polimorfismo 5-HTTLPR de los pacientes con esquizofrenia muestran una frecuencia alélica de 45.7% para el alelo corto (s) y de 54.3% para el alelo largo (l). Algunos autores relacionan el genotipo s/s con una disminución en la expresión de la proteína (61) y por tanto, relacionado con la desregulación de la actividad de la serotonina y el desarrollo de trastornos de tipo mental, de hecho, una de las teorías que hablan sobre el origen de la esquizofrenia, menciona que una desregulación en el sistema serotoninérgico puede estar relacionado con la fisiopatología de la enfermedad.

Los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas y genotípicas del grupo de pacientes con esquizofrenia sometidos a estudio, fueron comparadas con las frecuencias que se obtuvieron para un grupo de referencia denominado grupo control, conformado por individuos sanos y previamente tipificado por el laboratorio de Genética Psiquiátrica del Instituto Nacional de Psiquiátrica "Juan Ramón de la Fuente" (2). Los resultados de la comparación muestran que no existe una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de pacientes con esquizofrenia, lo que nos lleva a pensar en que la presencia de alguno de los dos posibles alelos del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina no se encuentran correlacionados con la enfermedad.

Estudios previos han correlacionado los polimorfismos de 5-HTTLPR del promotor del transportador de serotonina con trastornos depresivos (64), así como con la falta de respuesta al tratamiento con antidepresivos (65) y/o algunos trastornos de la ansiedad (66), por lo que resultaría interesante realizar la tipificación de este polimorfismo en pacientes que presentan este tipo de trastornos.

BIBLIOTECA UACM

Polimorfismos de las variantes alélicas de CYP2D6

La enzima CYP2D6 producto proteico codificado por el gen *cyp2d6* es responsable del metabolismo de 25% de los fármacos de la práctica clínica actual, entre los que se encuentran: antidepresivos (imipramina y amitriptilina), antipsicóticos (clorpromazina, haloperidol y risperidona), beta bloqueadores (carvedilol y metoprolol), entre otros.

Debido a la presencia de 2 pseudogenes (*cyp2d7* y *cyp2d8*) a cada lado del gen *cyp2d6* durante el proceso de recombinación se generan una gran cantidad de variantes alélicas, en muchos de los casos estas mutaciones pueden ser inactivantes en ambos alelos del gen *cyp2d6* (22q13.1), lo que en consecuencia puede generar un amplio espectro de actividad enzimática que se pueden clasificar en cuatro grupos basados en la capacidad para metabolizar los fármacos: metabolizador pobre (PM), metabolizador extensivo (EM), metabolizador intermedio (IM) y metabolizador ultrarrápido (UM). En muchos casos la predicción de la actividad de esta enzima es utilizada para explicar o predecir la respuesta en estudios con algunos medicamentos.

Las frecuencias poblacionales de las variantes alélicas de la enzima CYP2D6 han sido determinadas en diversas poblaciones, desde el descubrimiento de los polimorfismos de esta enzima, en la actualidad, existe un grupo que ha captado la atención y que corresponde a los metabolizadores pobres (PM), es decir, aquellos individuos portadores de una enzima defectuosa que impide el correcto metabolismo de los fármacos. Es necesario considerar que existen diferencias interindividuales en la prevalencia de los diferentes fenotipos que pueden ser encontrados mediante la genotipificación de CYP2D6, pero el de mayor relevancia clínica se centra en el fenotipo de metabolizador pobre que se encuentra en un rango de 0-2% en asiáticos (63), 5-10% en caucásicos (63).

Polimorfismos de las variantes alélicas cyp2d6*4

En nuestro estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de esta variante alélica que se presenta cuando existen una transición de G > A en la posición 1934 en el gen cyp2d6, lo que genera una mutación en el sitio de splicing resultando una proteína trunca y por tanto inactiva. La técnica de PCR-RFLP utilizada permitió determinar la presencia de tres genotipos *1/*1 (G/G) que corresponde a la wild type, o bien, a la enzima nativa y activa, lo que confiere un fenotipo de metabolizador extensivo (EM), el genotipo *1/*4 (G/A) que confiere un fenotipo de metabolizador intermedio (IM) con un alelo activo y otro inactivo, y por último el genotipo homocigoto *4/*4 (A/A) cuyo fenotipo corresponde a un metabolizador pobre (PM).

Los resultados de la genotipificación de cyp2d6*4 muestran que un 78.49% presenta un genotipo *1/*1 correspondiente a un fenotipo de metabolizador extensivo o normal, lo que sugiere en teoría que estos pacientes no presentarían ningún problema en lo que al metabolismo y biodisponibilidad de la cloropromazina se refiere, un 17.20% presenta un genotipo *1/*4 considerado fenotípicamente como metabolizador intermedio (IM) en donde uno de los dos alelos se afectado y por tanto podría relacionarse con aquellos pacientes que mostraron una respuesta parcial al tratamiento, por ultimo un 4.30% presenta un genotipo *4/*4 asociado con un estado de metabolizador pobre y por lógica se relacionaría con aquellos individuos que no respondieron al tratamiento.

De igual forma que con los otros polimorfismos, las frecuencias alélicas y genotípicas para cyp2d6*4 en pacientes con esquizofrenia fueron comparadas con un grupo control de individuos sanos y genotipificados por el laboratorio de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia (1). Los resultados de la comparación se obtuvieron calculando el estadístico de χ^2 utilizando un nivel de significancia $p < .05$, para las frecuencias alélicas se obtuvo una $p = 0.17$ y para las genotípicas $p = 0.38$, datos

que señalan que no existe relación en términos estadísticos entre los pacientes con esquizofrenia y los sujetos sanos de la población general.

Polimorfismos de las variantes alélicas *cyp2d610**

Otra de las variantes alélicas de importancia clínica en el metabolismo de los fármacos corresponde a la denominada *cyp2d6**10 caracterizada por el cambio de un citosina (C) por una timina (T) en la posición 188, que afecta la secuencia de la proteína en el sitio de unión con el sustrato, lo deriva en una enzima con una actividad disminuida.

En el presente estudio se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas para *cyp2d6**10 presentando tres genotipos: *1/*1 ó (C/C) que corresponde a la enzima nativa y activa con un fenotipo de metabolizador extensivo o normal (EM), *1/*10 ó (C/T) que aun y cuando uno de los alelos se encuentra afectado, este genotipo es también considerado como el de un metabolizador extensivo y por último, el genotipo *10/*10 (T/T) donde ambos alelos se ven afectados y corresponde al fenotipo de metabolizador intermedio (IM), a diferencia de la tipificación de la variante alélica *cyp2d6**4, aquí solamente encontramos dos estatus metabólicos EM y IM.

Las frecuencias genotípicas identificadas para *cyp2d6**10 muestran un 75.95% de individuos con el genotipo que corresponde a un metabolizador extensivo, resultados muy similares a los encontrados en la tipificación de la variante *cyp2d6**4 (78.49%), lo que puede validar el procedimiento de PCR-RFLP utilizado en la tipificación de ambas variantes alélicas, mientras que el genotipo *1/*10 relacionado de igual forma con un estatus metabólico normal se encuentran en un 18.99% de los pacientes con esquizofrenia y solo un 5.06% de los pacientes presentaría un disminución en el metabolismo de los fármacos atribuido al genotipo *10/*10 y fenotipo de metabolizador intermedio.

La comparación estadística entre el grupo de pacientes con esquizofrenia con un grupo control de individuos sanos tipificado por el laboratorio de Genética y Biología Molecular

del Instituto Nacional de Neurobiología y Neurociencia, se obtuvieron para las frecuencias alélicas se obtuvo una $p= 0.83$ y para las genotípicas $p = 0.059$, que de igual forma que el la variante alélica *cyp2d6*4* no muestra una diferencia significativa entre los casos y controles.

Correlación de la frecuencia genotípica para las variantes alélicas *cyp2d6*4*, *cyp2d6*10* y el polimorfismo 5-HTTLPR con el género de los pacientes con esquizofrenia.

Con el propósito de establecer si existe alguna relación entre la presencia de alguno de los polimorfismos genotificados en el presente estudio con el género de los pacientes con esquizofrenia se realizó la prueba de χ^2 a través del uso de tablas de contingencia $R \times C$, comparando los genotipos obtenidos para cada uno de los polimorfismos analizados con el sexo de los sujetos. Los resultados muestran que no existe relación alguna entre los polimorfismo *cyp2d6*4*, *cyp2d6*10* y 5-HTTLPR con el género de los pacientes con esquizofrenia, (p mayor a 0.05).

Correlación de la frecuencia genotípica para las variantes alélicas *cyp2d6*4*, *cyp2d6*10* y el polimorfismo 5-HTTLPR con el género de los pacientes con esquizofrenia.

Recordando los resultados mostrados en la tabla 16, podemos darnos cuenta de que un 30% de los pacientes, es decir, aproximadamente 30 pacientes no respondieron al tratamiento. Si correlacionamos estos datos con la frecuencia de metabolizadores pobres (PM) identificados en el presente estudios para la variante alélica *cyp2d6*4* que es la única que contempla un genotipo que establece este fenotipo y cuya frecuencia del 4.30% en los pacientes, podemos pensar en que no existe relación entre la presencia de este polimorfismo y la respuesta al tratamiento, lo cual, fue posteriormente comprobado al establecer la correlación entre el genotipo de esta variante alélica y la respuesta terapéutica, ($p= 0.59$), de las misma no existe correlación entre la presencia de la variante

alélica y/o el polimorfismo 5-HTTLPR con la respuesta terapéutica al tratamiento, resultados mostrados en las tablas 21, 25 y 31.

Estado metabólico determinado para los pacientes con esquizofrenia.

Estudios previos señalan que en población mexicana al 10% de los individuos presenta un fenotipo EM (1), mientras que los resultados del presente estudio muestran que un 4.30% de los pacientes presentan un genotipo asociado con un fenotipo PM y mas 75% de los pacientes muestran un genotipo en el que prevalece un estatus metabólico normal o fenotipo EM, es necesario considerar que un genotipo que se asocia con el estado de PM no es condicionante de que el fármaco no se metabolice o se elimine, no hay que perder de vista que un individuo que presenta un genotipo de metabolizador pobre puede recurrir a otras vías metabólicas para eliminar los fármacos y entre ellos podemos mencionar a los genes MDR y la glicoproteína P-gp, lo cual muy seguramente ocurre dados los resultados de nuestro estudio, ya que aproximadamente un 30% de los pacientes genotipificados no responde al tratamiento aun y cuando puede presentar un genotipo asociado con un estatus de metabolizador extensivo o normal, lo que sugiere que existen otros factores relacionados con la eficacia terapéutica de los antipsicóticos y que pueden ser ajenos a los dos polimorfismos tipificados en este estudio, como es el caso, en el que muchos de los medicamentos que no pueden ser metabolizados por CYP2D6, recurren a otras enzimas de la misma familia del citocromo P450 para ser biotransformados.

18. CONCLUSIONES

1. Para el polimorfismo del transportador de serotonina (5-HTTLPR) se determinó que el alelo largo (l) es el más frecuente con una presencia del 54.3% en los pacientes con esquizofrenia, mientras que el genotipo más frecuente corresponde al heterocigoto (s/l) con una frecuencia del 44.90%.
2. La variante alélica cyp2d6*4 se identificó que este alelo en un 12.90% de la población de pacientes con esquizofrenia, y el 78.49% de los pacientes presenta un genotipo asociado con la presencia de la forma nativa para CYP2D6.
3. La variante alélica cyp2d6*10 se encuentra presente en 14.20% de los pacientes con esquizofrenia y siendo el genotipo más frecuente encontrado *1/*1 que corresponde a una enzima con actividad normal,
4. No se identificó una correlación entre la presencia de los polimorfismos 5-HTTLPR, cyp2d6*4 y cyp2d6*10 con el género de los pacientes sujetos a estudio y la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco antipsicótico (clorpromazina).

5. Entre el 75 – 90% de los pacientes presentan un genotipo asociado con un estado de metabolizador extensivo (EM), mientras que de un 5-17% con el estado de metabolizador intermedio (IM) y solo un 4.3% con el estado de metabolizador pobre.

6. Con base en los resultados no podemos establecer una correlación entre la presencia de alguno de los polimorfismos identificados en este estudio (5-HTTLPR, cyp2d6*6 y cyp2d6*10) con el género y/o la respuesta terapéutica al tratamiento con antipsicóticos en los pacientes con esquizofrenia, lo que sugiere que existen otros factores biológicos que pueden estar relacionados con la eficacia terapéutica de los antipsicóticos, los cuales pueden ser ajenos a los polimorfismos identificados en el presente estudio.

7. Se establece que no existe una diferencia significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos 5-HTTLPR, cyp2d6*4 y cyp2d6*10, entre el grupo de pacientes con esquizofrenia y los grupos control genotipificados por otros laboratorios en población mexicana.

19. Apéndice I

Gráfico 2. Representación de las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en pacientes con esquizofrenia.

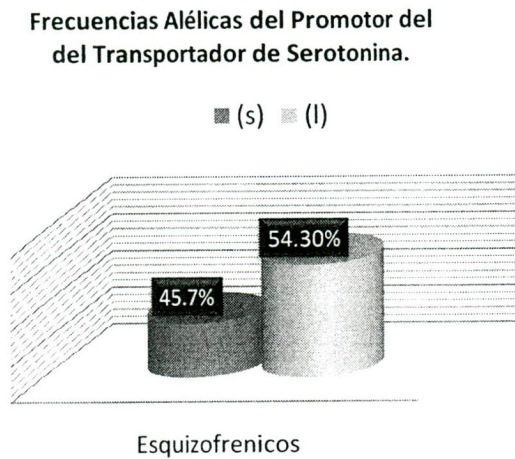


Gráfico 3. Representación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en pacientes con esquizofrenia.

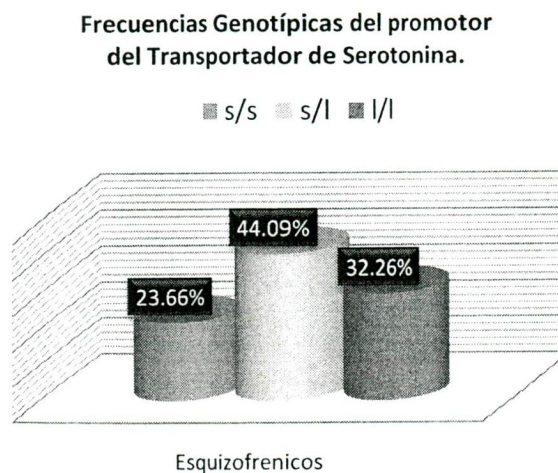


Gráfico 4. Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en casos y controles.

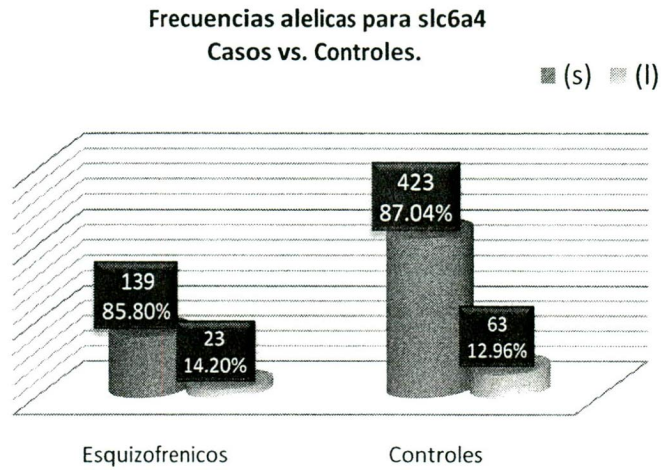


Gráfico 5. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del promotor del transportador de serotonina (SLC6A4) en casos y controles.

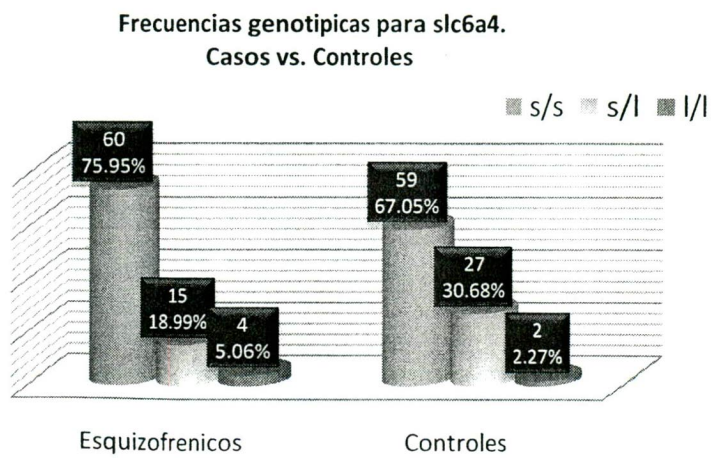


Gráfico 6. Representación de las frecuencias genóticas para 5-HTTLPR agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

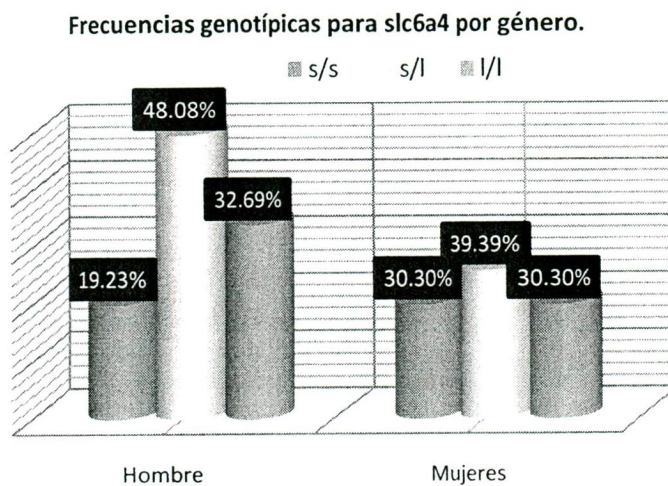


Gráfico 7. Representación de las frecuencias genóticas para 5-HTTLPR agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.

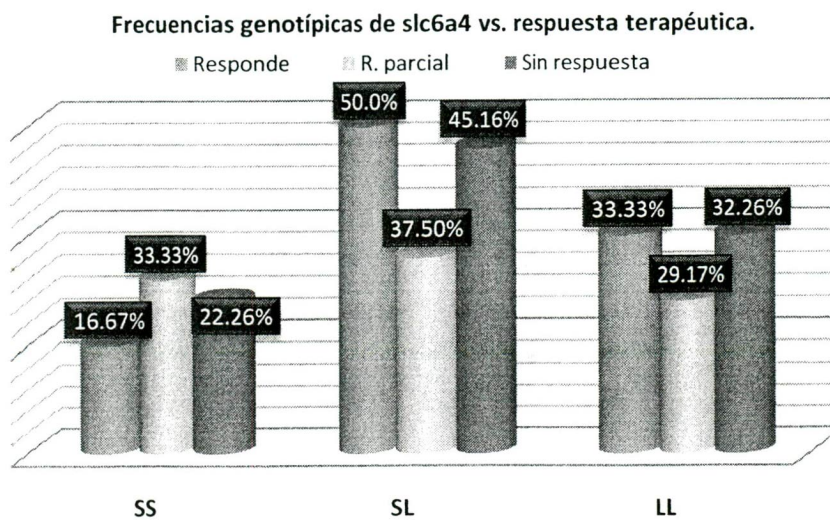


Gráfico 8. Representación de las frecuencias alélicas para la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

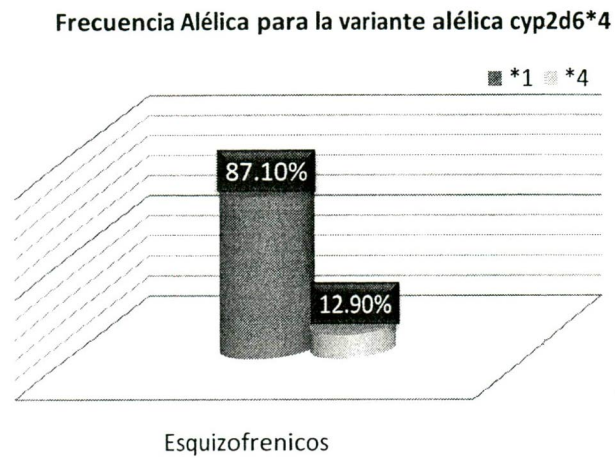


Gráfico 9. Representación de las frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

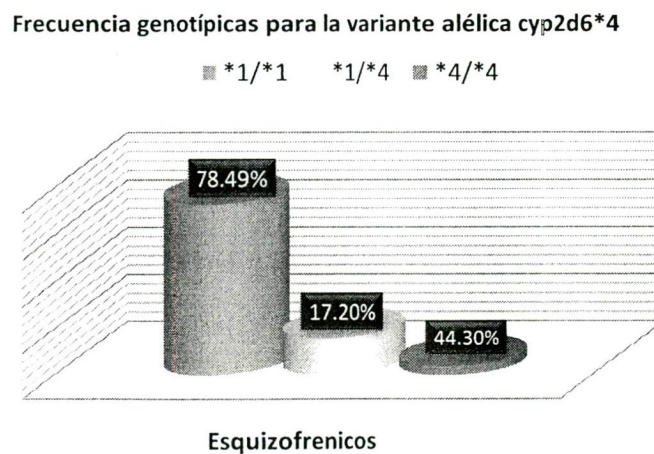


Gráfico 10. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en casos y controles.

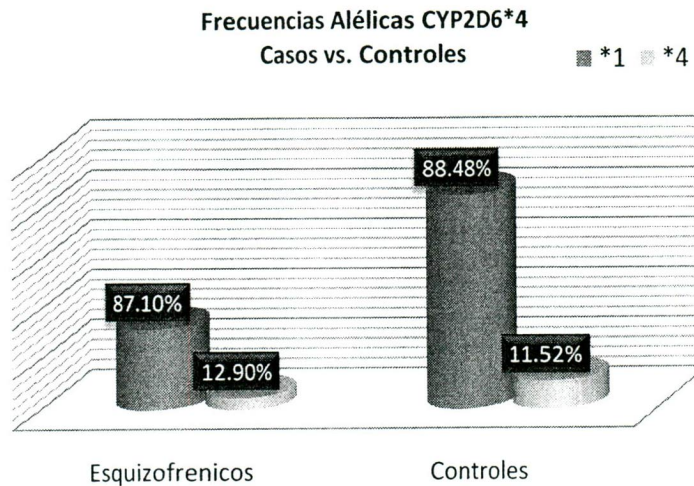


Gráfico 11. Comparación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 en casos y controles.

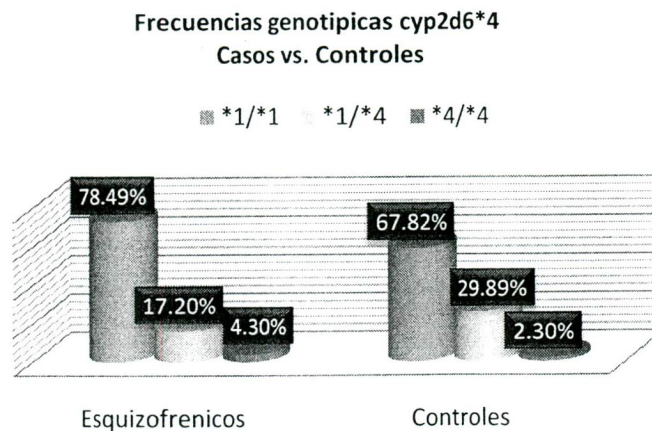


Gráfico 12. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

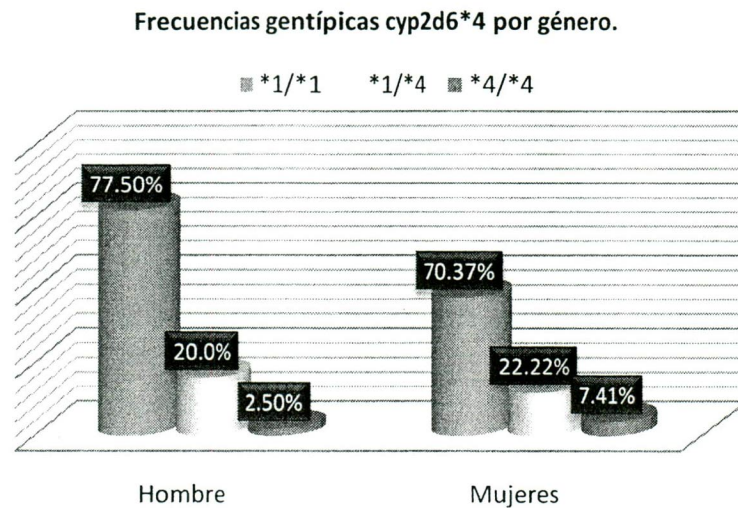


Gráfico 13. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*4 del gen cyp2d6 agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.

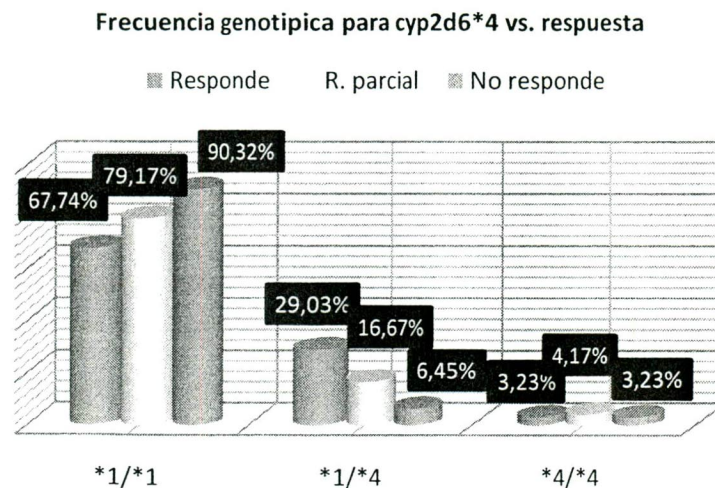


Gráfico 14. Representación de las frecuencias alélicas para la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

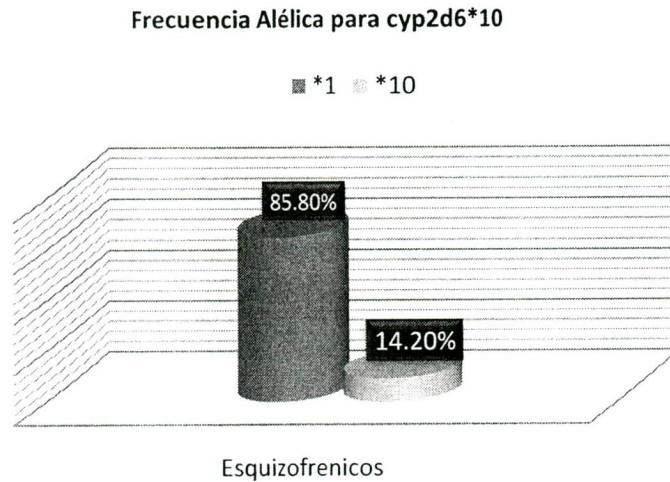


Gráfico 15. Representación de las frecuencias genotípicas para la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en pacientes con esquizofrenia.

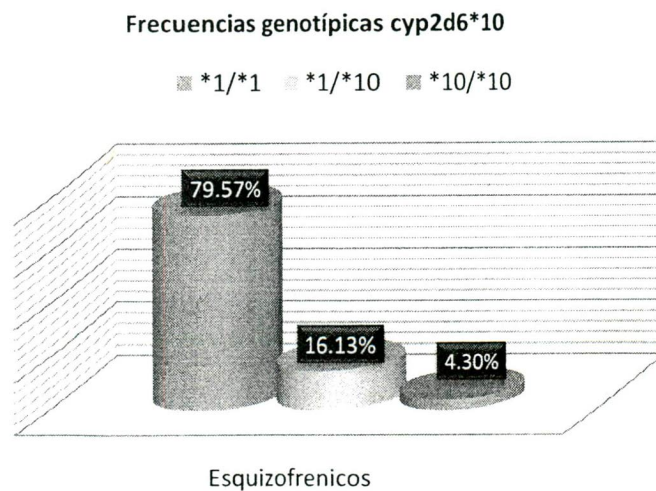


Gráfico 16. Comparación de las frecuencias alélicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en casos y controles.

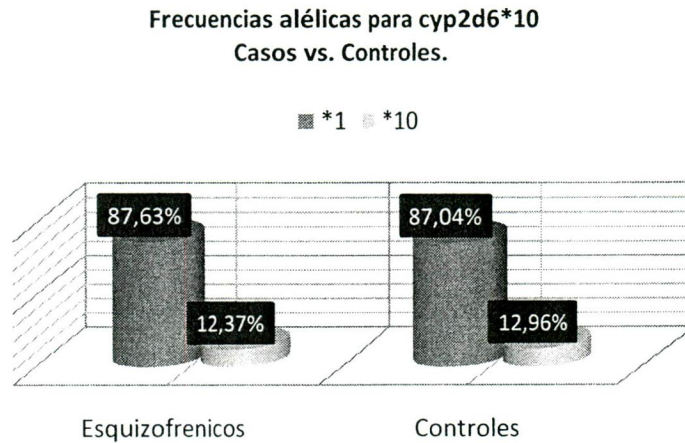


Gráfico 17. Comparación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 en casos y controles.

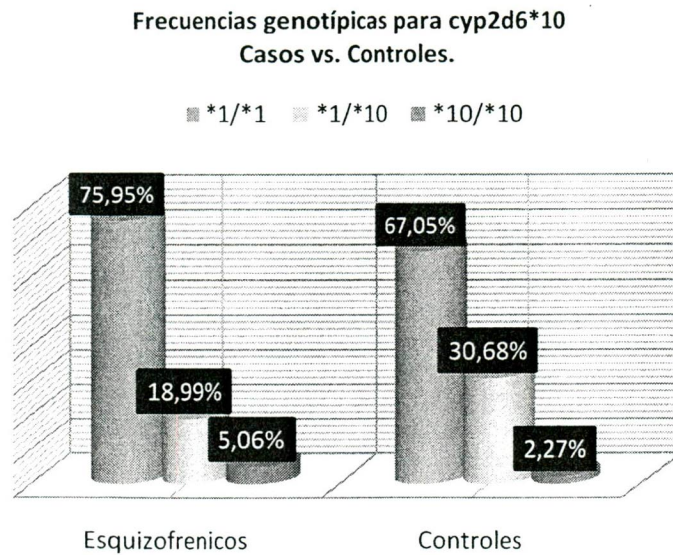


Gráfico 18. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 agrupadas por género, comparando genotipo vs. género.

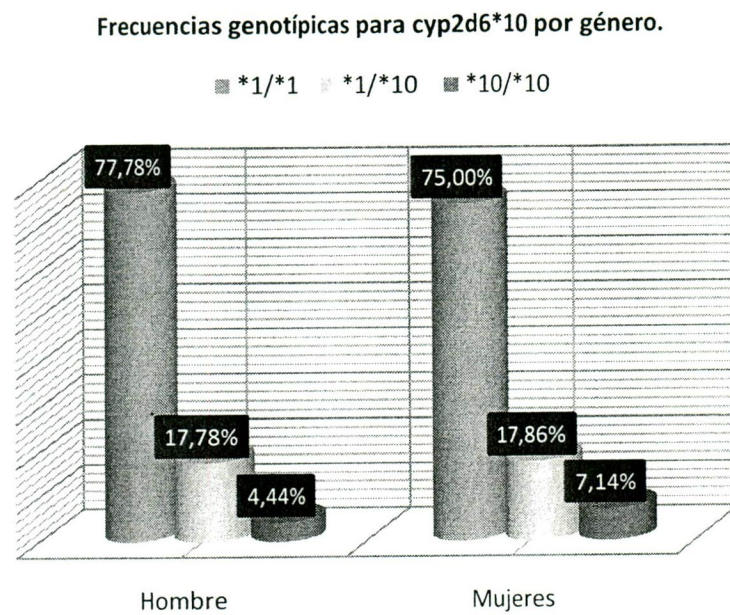
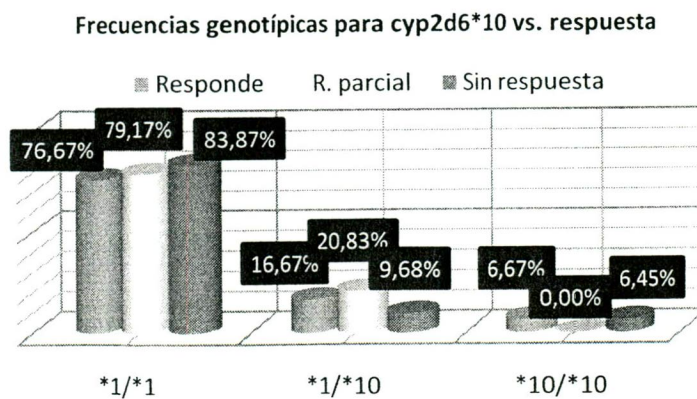


Gráfico 19. Representación de las frecuencias genotípicas de la variante alélica cyp2d6*10 del gen cyp2d6 agrupadas por respuesta terapéutica, comparando genotipo vs. respuesta.



20. Apéndice II

Reactivos utilizados y su preparación

Acetato amonio, 10M

Disolver 385.4 g de acetato de amonio en 150 ml de agua destilada. Aforar a 500 ml con agua destilada.

Acetato de sodio, 3M

Disolver 408 g de acetato de sodio $3H_2O$ en agua destilada. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético 3 M. Aforar con agua destilada a 1 L.

Acetato de sodio 1 M, pH 5.2 (100 ml)

Disolver 13.6 g de acetato de sodio trihidratado en 80 ml de agua destilada o desionizada. Ajustar el pH a 5.2 adicionando ácido acético glacial (aproximadamente 2 ml). Ajustar el volumen final a 100 ml. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Agarosa al 2% y 3%

Disolver 2 g ó 3 g de agarosa en 98 ml de agua bidestilada. Adicionar a la solución 2 ml de TAE 50X, homogeneizar y disolver la agarosa en horno microondas o en baño María. Asegurarse que todas las partículas de agarosa se fundan completamente, para facilitar los fragmentos del ADN durante el corrimiento se puede adicionar bromuro de etidio a una concentración de 0.5 ml/ ml en el gel.

Amortiguador de carga para electroforesis (loading solution)

0.25% azul de bromofenol; 0.25% de xilencianol; 30% p/v glicerol; 10 ml de EDTA 25 mM. Adicionar 3 g. de glicerol a una probeta. Llevar a 9.5 ml. con agua destilada. Adicionar 0.5 ml. de 0.5 M EDTA. Disolver 25 mg. de azul de bromofenol y 25 mg. de xilencianol en solución. Almacenar de 2 a 8°C.

Amortiguador de electroforesis stock TRIS-acetato (TAE) 50X

Preparar:

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	1.9 M
Ácido acético glacial	571 ml	57.1%
EDTA 0.5M pH8.0	100 ml	0.05 M

Completar con 1 L de agua bidestilada

Amortiguador TE

Tris-HCl 10 mM; EDTA 0.1mM, pH 8.0 (1L). Mezclar 10 ml de Tris-HCl, pH 8, 0.2 ml. de EDTA 0.5 M y 990 ml. de agua destilada o desionizada. Fraccionar en frascos de 100 ml. y esterilice con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Azul de bromofenol, solución

20 ml de glicerol; 4 mg de Azul de bromofenol. Aforar a 100 ml con agua destilada. Cuando la solución se encuentra saturada, algunos sólidos de azul de bromofenol se hacen visibles.

Solución “stock” de bromuro de etidio (10 mg/ml)

Pesar 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua bidestilada. Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

Bromuro de etidio 1 mg/ml (100 ml)

Utilizar guantes y mascarilla cuando lo pese. Adicionar 0.1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua destilada o desionizada. Agitar sobre un agitador magnético por varias horas para disolver el colorante. Cubrir el contenedor con papel aluminio o transferirlo a un bote ámbar. Almacenar de 2-8°C.

Solución de trabajo de bromuro de etidio (1 µg/ml)

Diluir 100 µL de bromuro de etidio a partir de la solución “stock” en 100 ml de agua bidestilada. Cubrir el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

PRECAUCIÓN: El bromuro de etidio es un mutágeno potencial, cancerígeno y moderadamente tóxico, manéjelo con sumo cuidado.

Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.5M

Disolver 186.1 g de disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 700 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 M (aproximadamente 50 ml). Aforar con H_2O a 1 L.

EDTA 0.5M, pH 8.0 (1L)

Lentamente adicionar 186.1 g de EDTA $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 800 ml de agua destilada o desionizada. Agitar vigorosamente sobre un agitador magnético. Ajuste el pH a 8.0 adicionando NaOH en lentejas (aproximadamente 20 g). NOTA: El EDTA no se disolverá si

no se ajusta el pH. Afore a 1 L con agua destilada y desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

NaOH 10M, 10 N (1L)

Lentamente disolver 400 g de lentejas de NaOH en 800 ml de agua destilada o desionizada. Enfriar a temperatura ambiente. Ajuste el volumen a 1 L. Almacenar a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: El hidróxido de sodio es cáustico y esta reacción genera calor.

Tris-HCl, pH 8.0 (1L)

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada o desionizada. Ajuste el pH a 8.0 a temperatura ambiente agregando HCl concentrado (aproximadamente. 45 ml)

NOTA: Muchos tipos de electrodos no miden exactamente el pH del amortiguador Tris; asegurándose de obtener los electrodos adecuados para el ajuste del pH del amortiguador Tris, ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada o desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

21. BIBLIOGRAFIA:

1. Marisol López, et. al., CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population, *Eur J Clin Pharmacol* (2005) 61: 749–754
2. Beatriz Camarena, et. al., Association study of the serotonin transporter gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder, *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2001), 4, 269±272.
3. American Psychiatric Association. Practice Guideline for the treatment of patients with schizofrenia, 2nd edition. Washington, DC. American Psychiatric Association. 2004.
4. World Health Organization. Schizophrenia and public Health. 1998.
5. Knapp M. and Kavanagh S. Economic outcomes and costs in the treatment of schizophrenia. *Clin. Ther.* 1997. 19: 128-138.
6. DMS-IV Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: trastornos de ansiedad, 1a. ed. Masson, 387-412 pp. 2002.
7. ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision).
8. Bromet E.J. and Fennig S. Epidemiology and natural history of schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 1999. 46: 871-881.
9. Gelder M.G, López J.J., Ibar J., Andreasen N. Esquizofrenia y trastornos psicóticos agudos de carácter transitorio. En: Tratado de psiquiatría. Ed. Ars Medica. 1ª edición. 2003. pp 677-771.
10. Programa Nacional de Esquizofrenia 2001- 2006.
11. Krausz M. et. al., Efficacy review of antipsychotics. *Curr. Med. Res Opin.* 2002. 18: s8-s12
12. Ho B-Ch., Black D.W., Andreasen N.C. Esquizofrenia y otros trastornos psicóticos. En: Fundamentos de Psiquiatría clínica. Hales R.E., Yudofsky S.C. Ed. Madsson. 2ª edición. 2005 pp 201-257.

13. McGue, M. & Gottesman II, The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, (1991), 240, 174-181.
14. Harrison, P.J. & Owen, M.J. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications, *Lancet*, (2003), 361, 417-417.
15. Jordi E. et. al., Etiología y Signos de Riesgo en la Esquizofrenia, *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 2003, Vol. 3, Nº 2, pp. 235-250
16. Henriette R.V., Bases genéticas de la esquizofrenia: "Nurture vrs Nature", *Actualidades en Psicología*, 2003, Vol. 19, No. 106, 131-138
17. Miyamoto S., Duncan G.E., Marx C.E., Lieberman J.A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotics drugs. *Mol. Psychiatry*. 2005. 10: 79-104.
18. Abi Dargham A. and Laurelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotics drugs in schizophrenia. Insights from brain imaging studies. *Eur. Psychiatry*. 2005. 20: 15-27.-
19. Lewis D.A. and Lieberman J.A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. 2000. *Neuron*. 28: 325-334
20. Miyamoto S., LaMantia A.S., Duncan G.E., Sullivan P., Gilmore J. Lieberman J.A. Recent Advances in the Neurobiology of Schizophrenia. *Mol. Interv*. 2003. 3: 27-39.
21. Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur. J. Clin. Invest*. 2003. 33(suppl. 2): 17
22. Owen M.J., Williams N.M., O'Donovan M.C. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol. Psychiatry*. 2004. 9: 14-27
23. Kapur S. and Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2003. 27: 1081-1090.

24. Kapur S. and Remington G. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. *Annu. Rev. Med.* 2001. 52: 503-517.
25. J. M. Delieu, Antipsychotic drugs result in the formation of immature neutrophil leucocytes in schizophrenic patients, *Journal of Psychopharmacology* 15(3) (2001) 191–194.
26. Academic Highlights. The Scourge of EPS: Have atypical antipsychotics solved the problem. *J. Clin. Psychiatry.* 2000. 61: 955-962.
27. Jones H.M. and Pilowsky L.S. Dopamine and antipsychotic drug action revised. *Br. J. Psychiatry.* 2002. 181: 271-275
28. Barnes T.R.E. and Spence S.A. Movement disorders associated with antipsychotic drugs: clinical and biological implications. In: *The Psychopharmacology of schizophrenia.* Ed. M.A. Revely & J.F.W. Deakiu, Annad editorial. London. 2000. pp 178-210.
- 29.
30. Prior T.I. and Baker G.B. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J. Psychiatry. Neurosci.* 2003. 28: 99-112.
31. Shimada T et al., *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270 (1) (414)
32. Prior T.I. and Baker G.B. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J. Psychiatry. Neurosci.* 2003. 28: 99-112
33. Pirmohamed M. and Park B.K. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology.* 2003. 192: 23-32.
34. Brockmoller J., et. al. The impact of the CYP2D6 polymorphisms on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002. 72: 438-452.
35. Sharon L. et. al, Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain, *J Psychiatry Neurosci* 2002;27(6):406-15.

36. Medina M, et al: Prevalence, service use, and demographic correlates of 12-month DSM-IV psychiatric disorders in Mexico: results from the Mexican National Comorbidity Survey, *Psychol Med*, 35(12): 1773-83, 2005.
37. Stahl SM, *Essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications*, 2a.ed. Cambridge University Press, 135-199 pp. 2002.
38. Berry N., Jobanputra V., Pal H. Molecular genetics of schizophrenia: a critical review. *J. Psychiatry Neurosci.* 2003. 28: 415-429
39. Cichon S., Nöthen M.M., Rietschel M., Propping P. Pharmacogenetics of schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 2000. 97: 98-106
40. Kasper L., et.al. *Principios de Medicina Interna de Harrison*, 16a.ed. McGraw Hill, 2003.
41. Martin Hersberger,* 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, *Clinical Chemistry* 46:8 (2000) 1072–1077
42. Cascorbi, Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication, *European Journal of Clinical Investigation* (2003) 33 (Suppl. 2), 17–22
43. Evans WE, Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-91, 1999
44. Farreras y Rozman, *Tratado de Medicina Interna*, 14a. ed. Harcourt. Madrid España, 2003.
45. Barbeau A, Cloutier T, Roy M, Plasse L, Paris S, Poirier J. Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *Lancet*:1213-1216 (1985).
46. Poirier J, Roy M, Campanella G, Cloutier T, Paris S. Debrisoquine metabolism in Parkinsonian patients treated with antihistamine drugs. *Lancet*:386 (1987).
47. Ohmori O, et al., Tardive dyskinesia and debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) genotype in Japanese schizophrenics. *Schizophr Res.* 1998 Jul 27;32(2):107-13.

48. Liou YJ, et. al., Cytochrome P-450 2D6*10 C188T polymorphism is associated with antipsychotic-induced persistent tardive dyskinesia in Chinese schizophrenic patients. *Neuropsychobiology*. 2004;49(4):167-73.
49. Roose SP: Depresión, anxiety, and the cardiovascular system: the psychiatrist's perspective, *J Clin Psychiatry* 62: 19-22, 2001.
50. Rumsfeld, JS, et al: Depression and Cardiovascular Disease, *Circulation* 111: 250-253, 2005.
51. Eloise Peet, et. al. Association of the 5-httlpr with prolactin response to citalopram an a community population, Eloise Peet, BS University of Pittsburgh, 2004
52. Fischer JA, et al: An inherited mutation associated with functional deficiency of the α subunit of the guanine nucleotide binding proteins Gs in pseudo-pseudopseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 935, 1998.
53. Sheehan DV, et al: Reliability and validity of the MINI Internacional Neuropsychiatric Interview (MIN), *European Psychiatry* 12: 232-241, 1997.
54. Hardman JG, Limbird LE, Molinof PB. Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª. ed. McGraw-Hill Interamericana. Vol.II, 459-471 pp. 1996.
55. Kim K, Jonson J y Hartmut S: Differences in Drug Pharmacokinetics Between East Asians and Caucasians and the Role of Genetic Polimorphisms. *J. Clin Pharmacol* 44: 1083-1105. 2004.
56. Guengerich PF: Cytochrome P450 enzymes, *Am Scientist* 81: 440-447.1996.
57. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ: High resolution crystal structure of cytochrome P450. *J Mol Biol* 195: 687-700, 1987.
58. Nelson D, Kamataki T, Waxman D: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping DNA. *Cell Biol* 12: 1-15, 1993.
59. Ingelman SM: Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its application on drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25: 193-200, 2004.

60. Evans WE, Relling MV: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-91, 1999.
61. Lesch K P, et al: Organisation of the human serotonin transporter gene, *J Neural Trans* 95: 157-162, 1994.
62. Heim M, Meyer UA (1990) Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 336:529-532
63. Christoph S., et. Al. Cytochrome P450 2D6 Variants in a Caucasian Population: Allele Frequencies and Phenotypic Consequences. *Am. J. Hum. Genet.* 60:284-295, 1997.
64. Yu, YW, et. al. Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *Molecular Psychiatry* 7:1115-1119, 2002.
65. Jeffrey B., Analysis of Association Between the Serotonin Transporter and Antidepressant Response in a Large Clinical Sample, *Biol Psychiatry* 2007;61:734–742 735
66. Chiara, M., Rol of Serotonin Transporter Promoter Polymorphism in Anxiety-Related Traits, *Arch. Gen. Psychiatry.* Vol. 55, Oct 1998.

Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.