

Utilidad del AmpliChip CYP450® para el genotipado del citocromo CYP2D6

A. Cortés Bosch de Basea*, L. Paré Brunet*, L. Sedano Marín, E. del Río Conde, M. Baiget Bastús

Resumen

El citocromo P450-2D6 (*CYP2D6*) es una enzima que participa en el metabolismo de un gran número de fármacos. La actividad del *CYP2D6* es extremadamente variable debido a la existencia de múltiples variantes alélicas.

Los métodos tradicionales para el genotipado del citocromo *CYP2D6* que se fundamentan en técnicas de PCR y sistemas de detección pos-PCR son complejos, consumen mucho tiempo y asumen el alelo normal (*1) por defecto.

El AmpliChip CYP450® es una micromatriz comercial que contiene más de 15.000 sondas de oligonucleótidos y permite detectar 33 alelos *CYP2D6* y tres alelos de *CYP2C19*.

El objetivo de este trabajo es evaluar el genotipado de *CYP2D6* mediante AmpliChip CYP450® y comparar los resultados con los obtenidos mediante un método convencional, en 21 muestras de ADN.

En 15 de las muestras analizadas se observa una concordancia total de los resultados obtenidos por ambos métodos.

Cinco de las seis muestras con resultados discrepantes presentan alelo *2 por método tradicional y alelo *35 por AmpliChip CYP450®. Se concluye que es más correcta la asignación de alelo *35 a estas muestras ya que el polimorfismo adicional que identifica dicho alelo no se detecta por métodos convencionales. En la última muestra discrepante se obtiene un patrón genotípico *1/*4 por método convencional y la matriz es capaz de detectar la presencia de alelo *4 pero no determina el otro alelo. La asignación de la existencia del alelo *1 por defecto se interpreta como incorrecta. El AmpliChip CYP450® es un método fiable para el genotipado del gen *CYP2D6* que permite determinar la presencia de los alelos más relevantes en un periodo de tiempo breve.

Palabras clave: Citocromo P450; AmpliChip CYP450®; *CYP2D6*

Summary. Utility of the AmpliChip CYP450® array for the cytochrome CYP2D6 genotyping

The cytochrome CYP2D6 is an enzyme involved in the metabolism of a large number of drugs. Its activity is extremely variable owing to the presence of numerous polymorphisms.

*Traditional methods for Cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) genotyping employ PCR techniques and post-PCR detection systems and are often tedious, time-consuming, and assume the wild type allele (*1) by default.*

The AmpliChip CYP450® array contains more than 15000 oligonucleotide probes and allows the detection of 33 CYP2D6 alleles and 3 CYP2C19 alleles. This study seeks to evaluate CYP2D6 genotyping by AmpliChip CYP450® and compare the results with those of a PCR-based method in 21 samples of DNA. In 15 of the 21 samples the results obtained using the array were in concordance with those obtained by the traditional method.

*Five of the six discrepant samples presented an allele *2 using the traditional method and *35 by amplichip. We conclude that the polymorphisms that determine the allele *35 are the same as those that determine the allele *2 plus a different one. Thus, it is more correct to assign allele *35 than allele *2 to this samples. The last discrepant sample was *1/*4 using the PCR-based method and the array was able to detect allele *4 but did not detect the other one. The assumption of the existence of allele *1 by default is incorrect.*

In conclusion, AmpliChip CYP450® is a highly reliable method for CYP2D6 genotyping and allows the correct determination of the CYP2D6 alleles in one single run.

Key words: Cytochrome P450; AmpliChip CYP450®; *CYP2D6*.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con las definiciones establecidas por la EMEA (Agencia Europea del Medicamento), se define Farmacogenómica (PGx) como los estudios de las variaciones en las características

del ADN y del ARN en relación con la respuesta a fármacos. Asimismo se define Farmacogenética como un apartado de la farmacogenómica que evalúa la influencia de las variaciones en las secuencias de ADN en la respuesta a fármacos (farmacocinética y farmacodinámica)(1).

En diciembre del año 2004, la FDA americana aprobó la primera prueba de farmacogenética que usaba micromatrices de ADN: el AmpliChip CYP450® (Roche Molecular Systems, Inc.) Esta prueba realiza genotipados paralelos masivos usando la plataforma de micromatrices GeneChip®System 3000Dx (Affymetrix, Inc.) El AmpliChip CYP450® evalúa dos genes

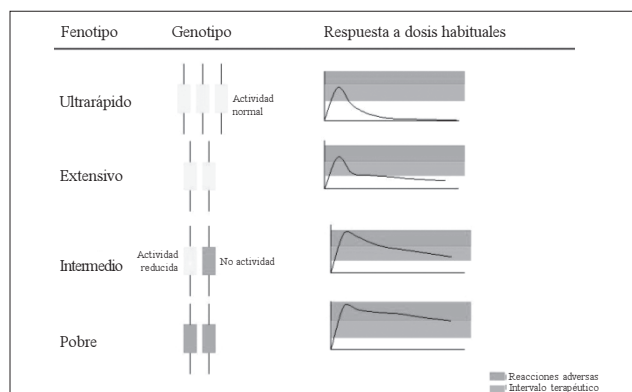
* Ambos autores han contribuido de igual manera en la elaboración de este artículo.
Servei de Genètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Barcelona

polimórficos de la familia de los citocromos *P450*, el *CYP2D6* y el *CYP2C19*.

El citocromo *CYP2D6* es una enzima que participa en el metabolismo de un gran número de fármacos. Se expresa en distintos tejidos, mayoritariamente en el hígado. El *CYP2D6* no puede ser inducido y por lo tanto, la ingesta de inhibidores de *CYP2D6* es el único factor ambiental que puede modificar de manera significativa su actividad. Cuanto menor es la influencia del impacto ambiental en una enzima metabólica, más fácil es evaluar el impacto de un polimorfismo genético en la actividad de dicha enzima. Esto hace del genotipado del *CYP2D6* un buen candidato para estudios farmacogenéticos. La actividad del *CYP2D6* es extremadamente variable debido a la existencia de un gran número de variantes alélicas que definen cuatro niveles principales de actividad (fenotipos): metabolizadores ultrarrápidos (UM), metabolizadores extensivos (normales) (EM), metabolizadores intermedios (IM) y metabolizadores pobres (PM). Se considera que un individuo UM tiene tres o más copias del gen activo *CYP2D6* por lo que muestra una actividad enzimática elevada. Los sujetos metabolizadores extensivos, EM, tienen dos copias funcionales del gen *CYP2D6* y presentan una actividad enzimática considerada fisiológica. Los individuos PM se caracterizan por la pérdida de sus alelos funcionales o por ser portadores de alelos que codifican para unas enzimas con una actividad muy disminuida. Finalmente, el fenotipo IM se asocia a la presencia de un alelo *CYP2D6* no funcional y a la de un alelo que codifica para una enzima con actividad disminuida. Los pacientes con fenotipo PM presentan un elevado riesgo de desarrollar reacciones adversas y toxicidad mientras que el fallo terapéutico o la falta de eficacia se atribuye a la presencia, en pacientes UM, del aumento del número de copias del gen *CYP2D6* (figura 1).

La mayoría de análisis genotípicos del *CYP2D6* se realizan en laboratorios de investigación y utilizan reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN juntamente con diversos métodos de detección pos-PCR. Las dos principales limitaciones de esta metodología son: 1) que el método es extremadamente laborioso y 2) que el alelo normal (alelo salvaje), llamado *1 se asume por defecto. Determinar cada una de las más de 90 variaciones genéticas del *CYP2D6* (2)

Figura 1. Esquema de los cuatro niveles principales de actividad del citocromo *CYP2D6*



usando este tipo de métodos no es factible en la práctica diaria. A pesar de que no existe ningún acuerdo sobre el número de alelos del *CYP2D6* que deberían ser determinados en un laboratorio de diagnóstico genotípico, un trabajo reciente (3) ha demostrado que la determinación de 24 alelos de *CYP2D6* es suficiente para este tipo de estudios.

El AmpliChip *CYP450*[®] es una matriz que contiene más de 15000 sondas de oligonucleótidos y permite detectar 33 alelos *CYP2D6* (tabla I); 24 de ellos se caracterizan por cambios en un solo nucleótido, (*2, *3, *4, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14A, *14B, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *36, *40 y *41), siete alelos poseen duplicaciones del gen (*1xN, *2xN, *4xN, *10xN, *17xN, *35xN y *41xN) y se denomina alelo *5 al portador de la delección del gen. Se detectan adicionalmente tres alelos *CYP2C19* (*1, *2 y *3.).

Puesto que consta de una serie de sondas de oligonucleótidos salvajes y mutantes, la utilización de la matriz AmpliChip *CYP450*[®] es capaz de identificar los alelos salvajes (*1), superando al método tradicional que los asume por defecto. Este nuevo método incluye un *software* que usa algoritmos para asignar los fenotipos *CYP2D6* y *CYP2C19*. El primer paso de la prueba AmpliChip *CYP450*[®] es similar al del método tradicional: consiste en amplificar segmentos de ADN mediante PCR.

Tras la fragmentación y el marcaje de los mismos, se aplican a la micromatriz para la hibridación y tinción, escaneado láser del patrón de intensidad fluorescente de hibridación y posterior interpretación del genotipo y fenotipo mediante el *software*. Se estima que un laboratorio con experiencia puede completar la prueba, desde la preparación de la muestra hasta la determinación genotípica, en dos jornadas laborales.

La tecnología de fabricación de las micromatrices combina métodos fotolitográficos y química combinatoria. La síntesis sobre una superficie de vidrio de más de 15000 sondas de oligonucleótidos diferentes permite analizar cadenas tanto homocodificadas como anticodificadas de una muestra de ADN amplificado. En la superficie de la micromatriz (20x20 μm^2), cada tipo de sonda se ubica en un área específica que se conoce como celda de sondas y contiene aproximadamente 10^6 - 10^7 copias de una determinada sonda. La micromatriz utiliza aproximadamente 240 sondas para detectar con exactitud cada uno de los polimorfismos (figura 2).

El factor limitante del empleo del AmpliChip *CYP450*[®] es el elevado coste tanto de las micromatrices como del equipo GeneChip[®] System 3000Dx indispensable para la lectura e interpretación de los resultados.

El objetivo de este trabajo es realizar el genotipado y fenotipado de muestras de ADN empleando la micromatriz AmpliChip *CYP450*[®] para la detección de mutaciones en el gen *CYP2D6* y comparar estos resultados con los obtenidos previamente mediante un método convencional (4).

MATERIAL Y MÉTODOS

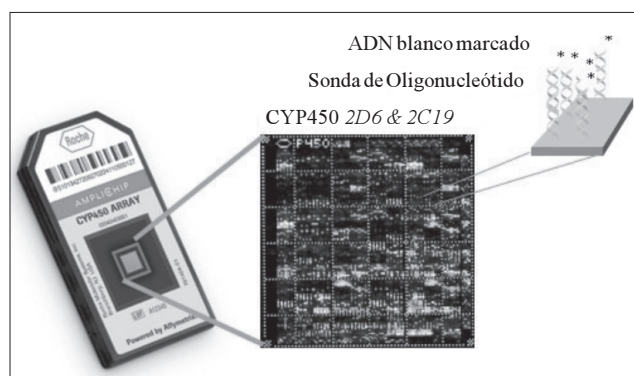
Se ha utilizado ADN extraído de las células nucleadas de sangre periférica mediante el método de precipitación de sales (5).

Se han analizado muestras de 21 pacientes a los cuales se les había determinado previamente el genotipo *CYP2D6* por un método que se describe, de forma resumida, a continuación.

Tabla I. Polimorfismos analizados por AmpliChip CYP450[®]

Alelo	Polimorfismos asociados
*1	Alelo salvaje o normal
*2	-1584G , C1039T, G1661C, C2850T , G4180C
*3	2549A del
*4	C100T, C1039T, G1661C, G1846A , C2850T, G4180C
*5	Delección del gen CYP2D6 completo
*6	1707T del , G1976A, G4180C
*7	A2935C
*8	G1661C, G1758T , C2850T, G4180C
*9	2613-2615 del AGA
*10	C100T , C1039T, G1661C, G4180C
*11	G883C , G1661C, C2850T, G4180C
*14A	C100T, G1758A , C2850T, G4180C
*14B	G1661C, G1758A , C2850T, G4180C
*15	T138Ins
*17	C1023T , G1661C, C2850T , G4180C
*19	G1661C, 2539-2542delAACT , C2850T, G4180C
*20	G1661C, 1973insG , C1978T, T1979C, C2850T, G4180C
*25	C3198G
*26	T3277C
*29	G1659A , G1661C, C2850T, G3183A , G4180C
*30	G1661C, repetición 1855-1863 ins (TTTCGCCCC) , C2850T, G4180T
*31	G1661C, C2850T, G4042A , G4180C
*35	-1584C, G31A , G1661C, C2850T, G4180C
*36	C100T, C1039T, G1661C, G4180C, conversión génica a CYP2D7 en el exón 9
*40	C1023T , G1661C, 1863ins(TTTCGCCCC)2 , C2850T G4180C
*41	-1584C , G1661C, C2850T , G4180C
*1xN	Genes *1 activos duplicados
*2xN	Genes *2 activos duplicados
*4xN	Genes *4 inactivos duplicados
*10xN	Genes *10 parcialmente activos duplicados
*17xN	Genes *17 parcialmente activos duplicados
*35xN	Genes *35 activos duplicados
*41xN	Genes *41 parcialmente activos duplicados

Se señalan en negrita los polimorfismos determinantes que definen el alelo


Figura 2. Imagen del patrón de hibridación.

El método empleado en nuestro laboratorio (4) se basa en una combinación de PCR's largas ("Long PCR"), secuenciación directa y PCR a tiempo real alelo-específica. El primer paso consiste en una PCR "multiplex" larga PCR 1 (ExpandTM

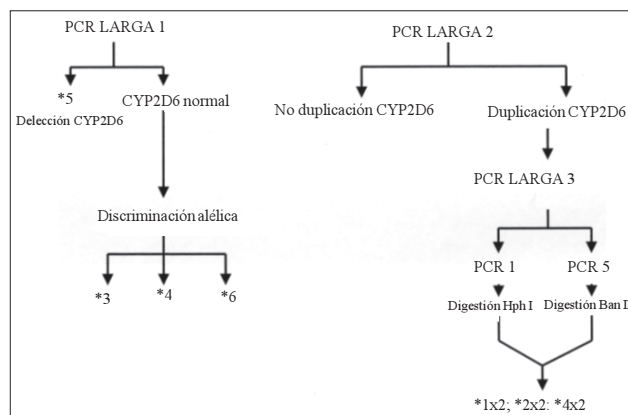
Long Template PCR System Roche Molecular Biochemicals[®]) que amplifica el gen CYP2D6 y detecta su delección (alelo *5). Cuando el gen CYP2D6 está presente se obtiene un producto de PCR de 4700pb mientras que los alelos que presentan una delección completa generan un producto de PCR de 3500pb.

Con el producto de la PCR que contiene todo el gen CYP2D6 se realizan una serie de PCR anidadas (reacciones 1 a 4) según el protocolo de Sachse et al (6). La secuenciación del producto de la PCR 1 permite identificar los alelos *10, *12 y *15. El producto de las PCR 3 y 4 también se secuencian para identificar los alelos *2, *8, *9, *12, *14 y *21. Los alelos nulos CYP2D6 *3, *4, *6, *7 y *8 se determinan mediante discriminación alélica con ABI PRISM 7000 Sequence Detection System[®] usando los kits comerciales de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para detectar el número de copias del gen CYP2D6 se utiliza una nueva PCR larga ("long PCR-2"). Se obtiene una banda de 3.6 Kb como producto de amplificación del gen CYP2D6. A las muestras que contienen esta banda se les realiza una PCR larga adicional ("long PCR-3") para posteriormente detectar el tipo de duplicación mediante una serie de digestiones enzimáticas. En la figura 3 se muestran, de forma esquemática, estos procesos.

La prueba de AmpliChip CYP450[®], motivo de este trabajo, se basa en seis procesos principales:

1. *Preparación de la muestra de ADN:* se prepara una solución de EDTA y Tris-HCl que se utilizará como diluyente de las muestras de ADN. Se mide la concentración de las muestras utilizando un espectrofotómetro y una vez conocida, se ajusta a una concentración final de 2 ng/μL.

2. *Amplificación mediante PCR de los genes CYP2D6 y CYP2C19* utilizando los reactivos comerciales (Master Mix, solución de

Figura 3. Diagrama metodológico para el análisis de las variantes alélicas del CYP2D6 mediante el método convencional.


cloruro de magnesio y dos soluciones de cebadores). La primera de estas mezclas de cebadores (Primer Mix A) contiene tres pares de iniciadores que flanquean las siguientes regiones: región reguladora y regiones codificadoras del gen *CYP2D6* así como un producto específico de la duplicación del gen *CYP2D6*. La segunda mezcla (Primer Mix B) contiene los cebadores cuyas secuencias corresponden a las que flanquean las siguientes regiones: del exón 4 al exón 5 del gen *CYP2C19* así como un producto específico de la delección del gen *CYP2D6*. Se utiliza una mezcla de ADN polimerasas AmpliTaq Gold.

3. *Fragmentación y marcado de los productos amplificados*: los productos amplificados se mezclan y se fragmentan a la vez por acción de la ADNasa I y se obtienen fragmentos con tamaños de entre 50-200 nucleótidos. Estos fragmentos se marcan, a continuación, con biotina en su extremo terminal 3' mediante la acción de una transferasa terminal.

4. *Hibridación y tinción de los productos fijados*: Los fragmentos de ADN marcados con biotina se añaden a un tampón de hibridación que contiene la solución de oligonucleótidos "B1 AmpliChip" que sirve como control de la hibridación. La mezcla se hibrida con los oligonucleótidos ubicados en la micromatriz usando el equipo GeneChip 450Dx de Affymetrix®. Una vez finalizada la hibridación, la micromatriz se lava y se tiñe con un colorante fluorescente (Ficoeritrina) conjugado con estreptavidina.

5. *Lectura óptica de la micromatriz*: Se realiza mediante el lector óptico GeneChip Scanner 3000Dx de Affymetrix® utilizando un láser que excita el marcado fluorescente fijado a los fragmentos de ADN. La cantidad de luz emitida es proporcional al ADN que se ha hibridado en cada una de las sondas de la micromatriz. La imagen generada se almacena en un archivo que se utilizará para el análisis de los datos.

6. *Determinación del genotipo CYP450 y asignación del correspondiente fenotipo*: para el análisis de los datos se utiliza el software operativo GeneChip (GCOS) y el de análisis de datos para AmpliChip CYP450®. El informe final recoge los distintos polimorfismos identificados, los alelos que éstos determinan y el fenotipo asociado. Se observa en la parte superior el genotipo y fenotipo *CYP2D6*, las mutaciones encontradas y en la parte inferior el genotipo y fenotipo *CYP2C19* (figura 4).

Figura 4. Ejemplo de los resultados obtenidos por AmpliChip CYP450®

The image shows a screenshot of the AmpliChip CYP450 report. The report is titled "AmpliChip CYP450 REPORT - 050250243051012007". It displays the following information:

- Header:** AmpliChip CYP450 REPORT - 050250243051012007
- Section 1: CYP2D6**
 - Gene: CYP2D6
 - Genotype: CYP2D6*4/CYP2D6*35
 - Predicted Phenotype: Extensive Metabolizer
 - Site: Call: 1 2A 2B 2D 3 4A 4B 4D 4E 4A 4B 4C 7 8 9 10A 10B 11 14A 14B 15 17 19 20 25 26 29 30 31 35 36 40 41
 - Table of results for various SNPs (e.g., C1580C, C310A, C1002T, etc.) with columns for WT and mutant alleles.
- Section 2: CYP2C19**
 - Gene: CYP2C19
 - Genotype: CYP2C19*1/CYP2C19*1
 - Predicted Phenotype: Extensive Metabolizer
 - Site: Call: 1 2 3
 - Table of results for SNPs (e.g., G272A, C360A) with columns for WT and mutant alleles.

RESULTADOS

De las 21 muestras analizadas (tabla II), en quince de ellas (muestras número 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 12, 16, 17, 18, 19 y 21) existe una concordancia total entre el genotipo realizado por el método clásico y el del AmpliChip CYP450®. A continuación se comentan los casos en los que existen resultados discordantes así como aquellos en los que ha habido alguna incidencia durante el proceso. En todos estos casos, hay que señalar que, a pesar de las diferencias entre los genotipos, los fenotipos asignados coinciden.

Tabla II. Resultados obtenidos en el genotipado del citocromo *CYP2D6*

Muestras	<i>CYP2D6</i> (M. convencional)	Fenotipo	<i>CYP2D6</i> (AmpliChip CYP450®)	Fenotipo
1	*1/*2	EM	*1/*2	EM
2	*1/*2	EM	*1/*2	EM
3	*1/*2	EM	*1/*2	EM
4	*1/*2	EM	*1/*35	EM
5	*1/*2	EM	*41/*35	EM
6	*1/*5	EM	*1/*5	EM
7	*1/*6	EM	*1/*6	EM
8	*1/*10	EM	*1/*10	EM
9	*2/*2	EM	*2/*2	EM
10	*2/*2	EM	*2/*2	EM
11	*2/*3	EM	*35/*3	EM
12	*2/*4	EM	*2/*4	EM
13	*2/*4	EM	*35/*4	EM
14	*2/*3	EM	*2/*3	EM
15	*4/*1	EM	*4/nd	EM
16	*4/*5	PM	*4/*5	PM
17	*5/*5	PM	*5/*5	PM
18	*1xN/*2	UM	*1xN/*2	UM
19	*1/*2xN	UM	*1/*2xN	UM
20	*1/*2xN	UM	*1/*35xN	UM
21	*1/*4xN	EM	*1/*4xN	EM

1) Mutaciones puntuales

Para las muestras 4, 11 y 13 podemos observar que uno de los alelos coincide mientras que el otro es siempre alelo *2 por método tradicional y alelo *35 por AmpliChip CYP450®. Esto se debe a que las mutaciones que caracterizan al alelo *35 son las mismas que las del alelo *2 más una de diferente (G31A), (tabla I). Es más que probable que estas tres muestras sean en realidad alelo *35 puesto que este alelo no se determinaba por el método clásico y en cualquier caso el fenotipo no varía.

En la muestra número 5 el patrón genotípico obtenido mediante el método tradicional es *1/*2, mientras que con la micromatriz se obtiene un genotipo *35/*41. La diferencia entre el alelo *2 y el alelo *35 se ha comentado en el párrafo anterior. El alelo *41 es una variante que contiene un residuo de citosina en lugar de guanina en la posición -1584 (7) que conlleva a una actividad enzimática disminuida, aunque dicha actividad sólo se observa *in vivo* en pacientes homocigotos para este alelo (8). Puesto que el alelo *41 no se determina de manera rutinaria mediante métodos convencionales, puede asumirse como un error la asignación de alelo *1 por defecto en esta muestra.

En la muestra número 15, el patrón genotípico obtenido por el método convencional es *1/*4 mientras que la matriz detecta el alelo *4 pero no es capaz de determinar el otro alelo. Puesto que con un segundo análisis utilizando el AmpliChip CYP450® se obtuvo idéntico resultado se ha remitido esta muestra a la sede central de Roche Diagnostics para su evaluación. Sin embargo puede asumirse que en la asignación de alelo *1 por método convencional se cometía un error, ya que, como se ha comentado anteriormente, este alelo se asignaba por defecto.

2) Deleciones

Tres del total de muestras analizadas poseen uno (muestras 6 y 16) o dos (muestras 17) alelos *5, que corresponde a la deleción total del gen *CYP2D6*. En las muestras 6 y 16 se obtuvieron idénticos resultados por ambos métodos. En el caso de la muestra 17, el método convencional identificó un individuo homocigoto para la deleción total del gen que comportaba un fenotipo de metabolizador pobre. Siguiendo un protocolo inicial para el manejo del AmpliChip CYP450® en el que se empleaba una concentración de ADN de 20ng/μl, el *software* detectaba la ausencia de hibridación, pero no era capaz de identificar si era debido a la presencia de una deleción homocigota o bien a un problema técnico en el proceso de hibridación. Este problema se solventó utilizando una concentración de ADN problema diez veces menor.

3) Amplificaciones

En cuatro muestras (18-21 en la tabla II) se detecta la presencia de dos o más copias del gen. En tres de ellas (18, 19 y 21) se obtienen idénticos resultados empleando ambos métodos. En la muestra número 20, el número de copias funcionales del gen coincide, por lo que el fenotipo corresponde a un patrón de metabolización ultrarrápida. Sin embargo, el empleo del AmpliChip CYP450® identifica con mayor rigor el tipo de gen duplicado: se detecta un alelo *35 en lugar de un *2, por las razones expuestas anteriormente.

DISCUSIÓN

Los citocromos son enzimas de fase I responsables del metabolismo de un gran número de fármacos. Debido a los numerosos polimorfismos de algunos de estos citocromos, como el *CYP2C9*, el *CYP2C19* y el *CYP2D6*, los genes que los codifican son buenos candidatos para estudios farmacogenéticos. Se estima que la predicción del fenotipo del citocromo *CYP2D6* podría mejorar la respuesta al tratamiento de un 30-40% de los fármacos sustrato del *CYP2D6*. Estos tratamientos farmacológicos implican principalmente al campo de la psiquiatría, de la oncología y de los trastornos cardiovasculares. Las técnicas utilizadas para el genotipado de este gen son muy laboriosas y sólo permiten distinguir un número limitado de alelos. Este hecho es una limitación importante en el estudio de genes que poseen una gran variabilidad alélica como es el caso del *CYP2D6*. La utilización de la tecnología de micromatrices puede ser de utilidad en algunos casos.

La recientemente desarrollada matriz, AmpliChip CYP450® para el genotipado del *CYP2D6* y *CYP2C19* es capaz de detectar de una manera rápida, 33 alelos del *CYP2D6* y tres alelos del *CYP2C19*.

Entre las muchas ventajas de esta nueva tecnología cabe destacar la detección del alelo salvaje (*1) ya que, como se ha comentado

anteriormente, éste se asumía por defecto en los métodos convencionales.

Ishida et al, en 2002 (9) determinaron los alelos *2, *3, *4, *6, *7, *8, *9, *10 (*10A y *10B) y *11 y la deleción del gen (alelo *5) en 81 muestras de individuos japoneses, usando un prototipo de AmpliChip CYP450 conocido como GeneChip. Paralelamente, secuenciaron los exones de este gen para comprobar la precisión de la matriz de Affymetrix. Comparando los resultados se observaron diferencias en tres muestras que eran portadoras del alelo *10C. En la población japonesa es muy frecuente (38%) la presencia de portadores de alelo *10 del que se conocen tres variantes (*10A, *10B y *10C). El prototipo utilizado no distinguía entre los alelos *10B y *10C, identificándolos a ambos como alelo *10B. Por otro lado, en este trabajo se mostró que la presencia del alelo *5 en heterocigosis no podía ser identificada con esta versión de la matriz.

Chou et al, en 2003 (10) recogieron muestras de 236 voluntarios sanos. Se les administró dextrometorfano para determinar su fenotipo *CYP2D6*. Paralelamente se determinaron los alelos del *3 al *7, *9, *17 y *41 y las múltiples copias del gen *CYP2D6* mediante PCR alelo-específica (AS-PCR). Por otro lado los alelos del *2 al *4 y del *6 al *11 fueron analizados mediante la matriz de Affymetrix CYP450 GeneChip. Se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos de los alelos *3, *4, *6, *7 y *9. Los resultados obtenidos demostraron una alta concordancia entre los dos métodos (>99%) aunque evidenciaron que esta versión no identificaba de manera correcta las duplicaciones del gen.

En 2006 el grupo alemán de Heller et al, (11) genotiparon 159 muestras mediante la matriz AmpliChip CYP450® (la misma versión que la utilizada en el presente trabajo) así como con un método basado en PCR-RFLP y la técnica SnaPshot. En 152 de las 159 muestras hubo una concordancia total de resultados. Las siete muestras discordantes presentaban duplicaciones del gen y fueron analizadas mediante la técnica de SnaPshot. El resultado obtenido mediante esta técnica coincidió con el obtenido mediante AmpliChip CYP450® en seis de las siete muestras discordantes. La secuenciación del gen *CYP2D6* de la muestra discordante confirmó el resultado obtenido por AmpliChip CYP450®.

En el presente trabajo se ha demostrado una concordancia total de resultados obtenidos por ambos métodos en 15 de las muestras analizadas.

En cuatro de las seis muestras discordantes (tabla I), uno de los alelos coincidía por ambos métodos mientras que el otro era *2, por método convencional y *35 por AmpliChip CYP450®. Esto se debe a que las mutaciones que caracterizan al alelo *35 son las mismas que las del alelo *2 más una de diferente (G31A). Existe una elevada probabilidad que el alelo correcto sea *35 puesto que las mutaciones que lo definen no se detectaban por métodos convencionales.

Existe una muestra en la que el genotipo obtenido mediante métodos tradicionales es *1/*2 y el obtenido mediante AmpliChip CYP450® es *35/*41. El alelo *41 es una variante que contiene un residuo de citosina en lugar de guanina en la posición -1584 (7) que conlleva a una actividad enzimática disminuida, aunque dicha actividad sólo se observa *in vivo* en pacientes homocigotos para este alelo (8) Puesto que el alelo *41 no se determina de manera rutinaria mediante métodos convencionales, puede asumirse como un error la asignación de alelo *1 por defecto en esta muestra.

En la última de las muestras discordantes se obtiene un patrón genotípico *1/*4 por método convencional y la micromatriz detecta

la presencia del alelo *4 pero no es capaz de determinar el otro alelo. Esta muestra se ha repetido diversas veces por AmpliChip CYP450® sin llegar a ningún resultado, por lo que se ha enviado a la sede central de Roche Diagnostics en Estados Unidos para que, expertos en AmpliChip la analicen. Sin embargo, puesto que la tecnología de AmpliChip es capaz de detectar el alelo *1 y en este caso no lo detecta como tal, se llega a la conclusión que asumiendo alelo *1 por defecto, se cometía un error.

En cuanto a la clasificación fenotípica convencional en cuatro grupos, basada en el genotipo (UM, EM, IM y PM), la concordancia en la asignación de fenotipos por AmpliChip CYP450® y mediante métodos convencionales fue del 100%.

El AmpliChip CYP450® permite una identificación rápida y precisa de los genotipos del *CYP2D6*. La fiabilidad del método queda contrastada y su rapidez, facilidad en el manejo y amplia detección de alelos la hacen realmente útil para su uso en laboratorios de diagnóstico genotípico.

El factor limitante del empleo del AmpliChip CYP450® es el elevado coste tanto de las micromatrices como del equipo GeneChip® System 3000Dx indispensable para la lectura e interpretación de los resultados.

El genotipado de este gen mediante el uso de dicha matriz puede mejorar la eficacia del tratamiento con algunos fármacos así como también reducir las reacciones adversas. Representa, por lo tanto, un importante paso en el tratamiento farmacológico personalizado y consiguientemente una herramienta prometedora para el creciente campo de la farmacogenética.

BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/43798606en.pdf>.
2. <http://www.imm.ki.se/cypalleles>
3. Cai WM, Nikoloff DM, Pan RM, de Leon J, Fanti P, Fairchild M, et al. *CYP2D6* genetic variation in healthy adults in psychiatric african/american

subjects: implications for clinical practice and genetic testing. *Pharmacogenomics J* 2006;6:343-50.

4. Menoyo A, del Río E and Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome *CYP2D6* in a Spanish population. *Cell Biochem Funct* 2005;23:1-5.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;16:1215.
6. Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian Population: allele frequencies and phenotype consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-95.
7. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369 1:23-37. Epub 2003 Nov 15.
8. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005;5:6-13.
9. Ishida S, Soyama A, Saito Y, Murayama N, Saeki M, Sai K, et al. Determination of *CYP2D6* gene alleles by the CYP450 probe array using the affymetrix GeneChip system: comparison with sequencing results. *Drug Metabol Pharmacokin* 2002;17:157-60.
10. Chou WH, Yan FX, Robbins-Weilert DK, Ryder TB, Liu WW, Perbost C, et al. Comparison of two *CYP2D6* genotyping methods and assessment of genotype/phenotype relationships. *Clin Chem* 2003;49:542-51.
11. Heller T, Kirchheimer J, Armstrong VW, Luthe H, Tzvetkov M, Brockmoller J, et al. AmpliChip CYP450 GeneChip: a new gene chip that allows rapid and accurate *CYP2D6* genotyping. *Ther Drug Monit*. 2006 Oct;28 5:673-7.

Correspondencia:

Anna Cortés Bosch de Basea
 Servei de Genètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
 C/ Pare Claret 167
 08025 Barcelona
 Telf: 93.5565511
 Fax: 93.2919494
 acortesb@santpau.es