

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA



ESCUELA DE MEDICINA



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Práctica de Farmacogenética

**Determinación del fenotipo del CYP2D6
utilizando dextrometorfano como droga
sonda**



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Escuela de Medicina
Departamento de Farmacología
y Toxicología Clínica



INTRODUCCIÓN:

Los citocromos son enzimas importantes para el metabolismo fisiológico. El citocromo 5 (*CYP 5*), en los vertebrados, es la tromboxano sintasa, el citocromo 7 (*CYP 7*) es la colesterol 7- α -hidroxilasa, el citocromo 8 (*CYP 8*) es la prostaciclina sintasa y el citocromo 17 (*CYP 17*) es la 17 α -hidroxilase de esteroides) y para la degradación de medicamentos y xenobióticos. Dichas enzimas son determinantes, no solo de los niveles plasmáticos que un individuo puede alcanzar con una dosis dada, lo que se traduce en la respuesta clínica, sino que tiene implicaciones en los efectos adversos. En Farmacología es necesario conocer estas características enzimáticas, pues explican, en parte, los bajos niveles y la poca respuesta terapéutica a una determinada dosis, o en otros casos, los altos niveles y los efectos tóxicos. También es importante para determinar y demostrar posibles interacciones entre diferentes medicamentos metabolizados por la misma enzima.

El 56% de los medicamentos que son citados en estudios de efectos adversos son metabolizados por enzimas de fase I y de ellos el 86% son metabolizados por citocromos. Los costos de los efectos adversos en EU son de \$ 100 billones de dólares anuales además de 100 000 muertes. Dosis usuales, según el tipo de metabolizador, puede llevar a niveles altos de un medicamento en una persona y a que esta sufra efectos adversos.

En los humanos existen 57 diferentes genes para enzimas de citocromos y por ejemplo en el arroz son 323 y en el ratón 102.

Tres familias de citocromos (1 a la 3) realizan el 75% del metabolismo de fase I de drogas de interés clínico, en humanos. Por lo que para la farmacología de medicamentos un puñado de enzimas, de tres familias, son las importantes a saber: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP 2E1 y CYP3A4. De ellos el CYP 2D6 metaboliza cerca del 25% de los medicamentos que usamos y el CYP3A4 cerca del 45%.

Xenobióticos metabolizados por el <i>CYP 2D6</i> (7,10)			
Amitriptilina	Haloperidol	Codeína	MDMA (éxtasis)
Clomipramina	Perfenazina	Dextrometorfano	
Imipramina	Tioridazina	Tramadol	
Desipramina	Risperidona		
Fluoxetina	Clozapina	Propranolol	
Paroxetina	Flufenazina		
Mianserina		Nicotina	

Los citocromos al ser proteínas son determinadas genéticamente y muestran variaciones alélicas lo que se traduce en polimorfismo. El CYP2D6 es uno de los citocromos que muestra polimorfismo. Se han identificado cuatro fenotipos divididos en lo que se conoce como: metabolizadores pobres (con enzimas no funcionales), metabolizadores intermedios (heterocigotos con un alelo sin actividad o tienen dos alelos de baja actividad), metabolizadores extensos (dos alelos con función normal) y metabolizadores ultrarrápidos (tienen varias copias del gen).

Aproximadamente un 7-10% de los blancos son metabolizadores pobres del 2D6, mientras 1-7% de los blancos y hasta el 25% de los etíopes son metabolizadores ultrarrápidos. Se estima que 25 millones de personas son metabolizadores pobres y 17,5 millones son metabolizadores ultrarrápidos.

Para determinar la actividad del CYP2D6 in vivo, se utiliza como sonda una dosis de dextrometorfano, el antitusivo, y se determina su razón en orina con respecto a su metabolito el (O-desmetilado) dextrotrorfano.

OBJETIVOS:

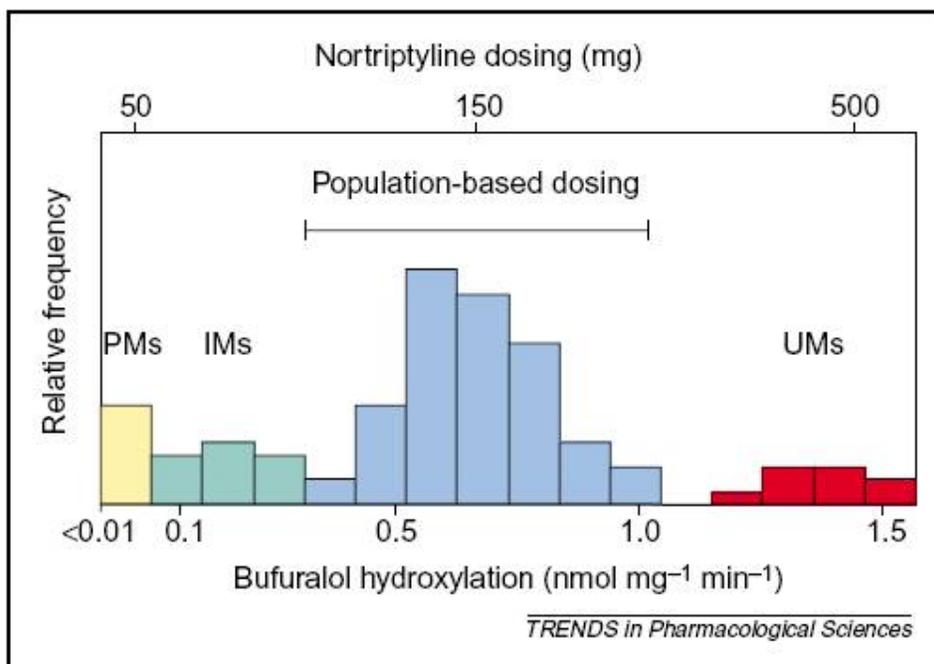
- 1-Determinar, a partir de una muestra de orina humana, la actividad enzimática del citocromo 2D6 (CYP2D6).
- 2-Conocer los efectos de los citocromos en el metabolismo de drogas y su influencia en la respuesta terapéutica.

INSTRUCCIONES:

Procedimiento

Los sujetos experimentales que participen deberán ayunar de productos que contengan, dextrometorfano por lo menos dos días antes de realizar la prueba.

Los estudiantes se dividirán en dos subgrupos de cuatro o cinco para realizar la prueba. Un subgrupo realizará la parte analítica y el otro subgrupo hará el reporte y vigilará por el cumplimiento de los requisitos y la entrega del mismo.



Variación fenotípica en una población europea para el CYP2D6 y con ejemplo de la variación en la dosis del antidepresivo tricíclico nortriptilina. TiPs abril 2004;25(4):193-200.

En la mañana del día de la prueba, previo ayuno de productos no permitidos, el sujeto experimental deberá vaciar el contenido de la vejiga e ingerir dos tabletas de dextrometorfano de una marca comercial, disponible en el país (equivalente a 20mg), con abundante agua. Previo a la ingesta del dextrometorfano el sujeto experimental deberá recoger una muestra de orina de unos 10 ml. Ésta será la muestra blanco y deberá estar etiquetada adecuadamente con el número del subgrupo y la letra B. Luego puede

Universidad de Costa Rica. Escuela de Medicina, Departamento de Farmacología

desayunar, ingerir líquido y comer como de costumbre siempre y cuando no consuma dextrometorfano.

A partir del momento en que se tomó el dextrometorfano, se recogerá toda la orina producida durante cinco o seis horas. Es decir, durante cinco o seis horas no se botará la orina sino que tiene que recolectarse. Toda esta orina se combina y de ahí se toma una alícuota para el análisis. Si el sujeto experimental no orina durante el período de las cinco horas, al final del mismo la orina que suministre, será toda la muestra.

Ningún estudiante será sujeto experimental ni deberá consumir medicamento alguno. Los sujetos experimentales son profesores voluntarios.

Una alícuota de orina se pone a hidrolizar para obtener el dextrorfano desconjugado y con esta se trabajará en la extracción.

La extracción del dextrometorfano y dextrorfano lo realizarán los estudiantes según método ya utilizado por el Depto. de Farmacología. Básicamente hay una fase de extracción y después de algunos procedimientos la fase lipofílica se evapora, el remanente se redissuelve y se inyecta en un cromatógrafo de líquidos.

Después de extraer los metabolitos de la orina y analizarlos por cromatografía líquida de alto rendimiento al estudiante se le entregarán tres cromatogramas (ver ejemplo adjunto) para realizar los cálculos. Los cromatogramas son gráficos realizados por un integrador donde aparecen una serie de picos cuya altura o área es proporcional a la concentración del metabolito en la orina. Cada pico es una sustancia y muestra un tiempo de retención (número que aparece en el borde derecho a la par de cada pico) que es característico para la sustancia y que permite identificarla merced a la ayuda de un estándar.

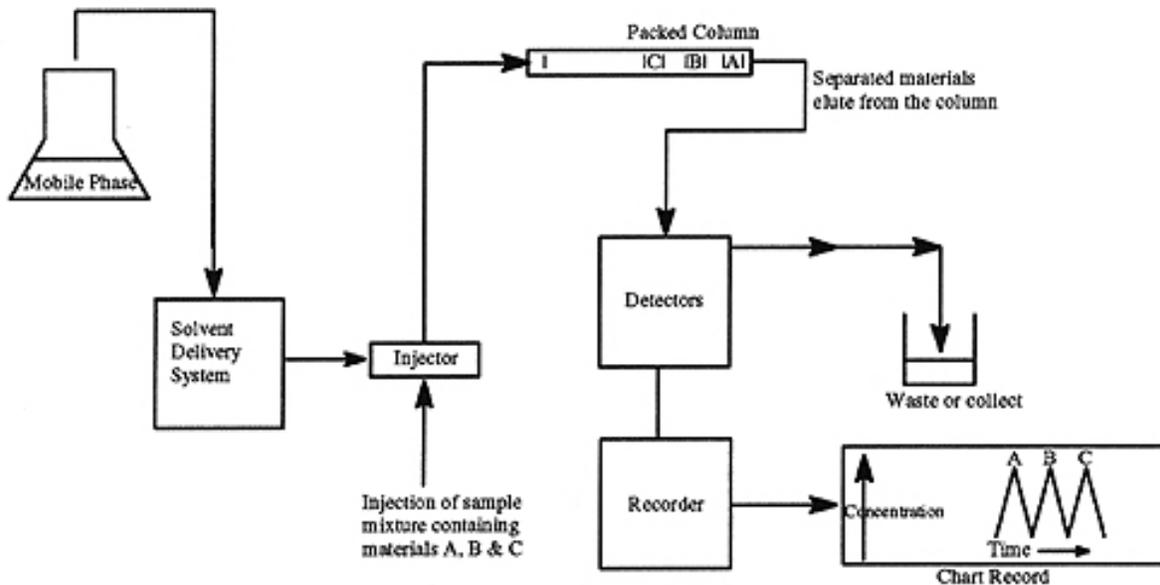
De los tres cromatogramas uno de ellos es de metabolitos de concentración conocida, por lo general de 10 micromolar, y nos sirve para identificar los metabolitos al comparar tiempos de retención. A este se le llama cromatograma de estándares externos. El segundo cromatograma es el blanco, de la orina previo a la toma del dextrometorfano y también nos sirve para discernir e identificar picos de metabolitos que puedan ser confusos. El tercer cromatograma, por lo general rico en picos, es de la orina del sujeto que consumió el dextrometorfano.

Cálculo de las actividades enzimáticas

Las concentraciones molares de dextrometorfano con respecto al dextrorfano dan una razón que permite ubicar al sujeto de estudio en alguno de los fenotipos citados abajo. Al identificar los picos (sustancias de interés) para los cálculos de las actividades enzimáticas,

se procede a calcular su concentración recurriendo a una simple regla de tres, para ello se utiliza la altura del pico del cromatograma del estándar externo, que es de concentración conocida, y se compara con la altura del pico correspondiente del cromatograma de muestra.

Esquema de un cromatógrafo de líquidos



Equipo de cromatografía líquida (HPLC) utilizado en el análisis

$$\text{Razón metabólica} = \frac{\text{Dextrometorfano (concentración molar)}}{\text{Dextrorfano (concentración molar)}}$$

Razón molar para la estimación del fenotipo:

Razón menor de **0,003** es metabolizador ultrarrápido.

Razón es entre **0,003 y 0,03** es un metabolizador extenso.

Razón es entre **0,03-0,3** es un metabolizador intermedio.

Razón es mayor de **0,3** es un metabolizador pobre. (NEJM diciembre 30 2004)

Metabolitos de interés para los cálculos en orden de aparición:

Metabolitos:

Dextrorfano

Dextrometorfano

Estándar

NORMAS DEL LABORATORIO:

- La nota obtenida por el subgrupo será la nota que se le asignará a todo el grupo.
- La práctica se realizará en el laboratorio de análisis del Departamento de Farmacología ubicado en el tercer piso de la Escuela de Medicina, al fondo del área de profesores. Los estudiantes deberán presentarse a la hora exacta y no estar en el área de profesores hablando o interrumpiendo la labor de estos.
- El estudiante deberá presentarse al laboratorio con gabacha blanca y anteojos de protección, de lo contrario no podrá trabajar.
- Todo equipo o material que el estudiante rompa por negligencia o descuido se le cobrará al precio del mercado.
- Antes de iniciar el laboratorio se realizará una prueba oral grupal (todos los estudiantes deben participar), deberá demostrar que domina la metodología y las bases teóricas que fundamentan el laboratorio.

- El laboratorio tendrá un valor de 3,0% de la nota aprovechamiento. Con 1.0% será calificado la prueba oral y otros rubros. Con un 1.0 % será calificado el trabajo en el laboratorio y 1.0% el reporte del mismo.
- Con respecto al reporte se calificará de la siguiente forma con base en 1.0 % de la nota de aprovechamiento: La presentación (incluir número de subgrupo y el nombre completo de los integrantes) 5%, introducción, objetivos del laboratorio 5%, resultados y explicación de los mismos 70%, conclusiones y bibliografía 20%.
- Con respecto al reporte se calificará la presentación y la puntualidad en la entrega del mismo. El reporte deberá ser entregado en la secretaría del Departamento de Farmacología en los cuatro días hábiles después de que le entregaron los cromatogramas.
- Un máximo de cuatro estudiantes, no más, ingresarán al laboratorio a trabajar por subgrupo.
- Si un estudiante está interrumpiendo o afectando el trabajo en el laboratorio se le invitará a abandonar el mismo.
- Traer una libreta donde tomar apuntes y datos de la práctica para luego hacer el reporte.
- La asistencia a las actividades teórico-prácticas es obligatoria y debe ser puntual, con la inasistencia injustificada al 10% de dichas actividades (una, 1) se pierde el curso completo, teoría y laboratorio. La llegada del estudiante 15 minutos después de que el profesor inició actividades académicas se considera una ausencia injustificada. Se aplica el reglamento de la Escuela de Medicina, artículo 37.
- El estudiante que llegue al laboratorio dentro de los 14 minutos de iniciado este, se le rebajará la nota correspondiente a este rubro, dentro de la calificación de la práctica.
- El estudiante deberá firmar, de su puño y letra, la lista de asistencia a las prácticas, laboratorios y conferencias, de lo contrario se le tomará como una ausencia injustificada.

EL REPORTE:

Los estudiantes deberán presentar un reporte sobre la práctica con dextrometorfano donde se debe incluir los cromatogramas, como se identificaron los picos de interés, los cálculos de las concentraciones y se procede a calcular la razón molar. Se calificará la presentación del reporte así como la puntualidad en la entrega del mismo (a más tardar cinco días hábiles después de retirar los cromatogramas). La otra parte de la nota estará dada por la forma como el grupo realizó la práctica (el trabajo en el laboratorio). La nota será la misma

para todo un grupo a menos que se informe que un estudiante en particular no hizo nada durante el trabajo.

¿Qué debe incluir el reporte?

- Nombre completo y carné de los integrantes del grupo
- Nombre del curso y siglas
- Número de subgrupo
- Nombre profesor tutor de la práctica
- Pequeña introducción
- Objetivo de la práctica
- Desarrollo
 - a) Incluir todos los cromatogramas
 - b) Indicar como identificaron los picos de interés (dextrofanano y dextrometorfano) en los cromatogramas.
 - c) Indicar y colocar todos los cálculos que realizaron (reglas de tres)
 - d) Hacer y colocar en el reporte una tabla con el siguiente formato

	Altura del dextrofanano	Altura del dextrometorfano	Tiempo de retención del dextrofanano	Tiempo de retención del dextrometorfano
Estándar				
Muestra #1				
Muestra #2				

- e) Calcular las razones metabólicas de las muestras versus lo estándares
 - f) Calcular el promedio de las razones metabólicas
- Conclusión (tipo de metabolizador)

PUNTOS A RECORDAR:

- 1 No consumir productos con dextrometorfano dos días antes de la prueba.
- 2 Recoger toda la orina de cinco o seis horas.
- 3 Antes de tomar el dextrometorfano recolectar una muestra de orina.
- 4 Hacer la prueba el día que se le fue asignado.

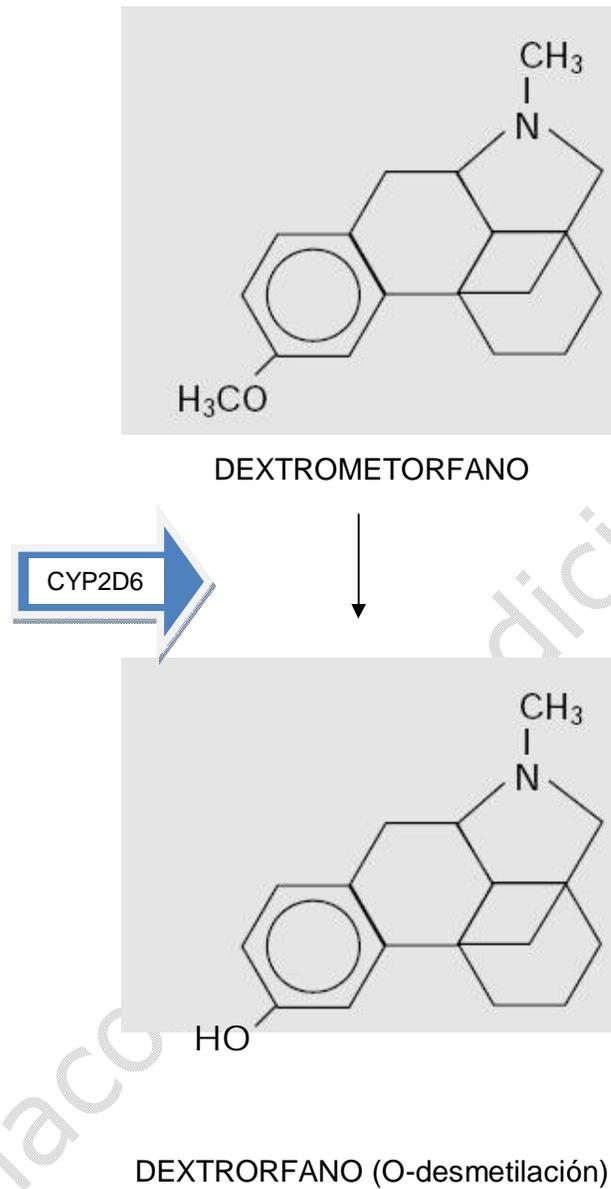
En el caso del dextrometorfano (uno de los antitusivos de uso más común) se sabe que el CYP2D6 lo metaboliza por medio de una O-desmetilación a dextrofanano, de tal manera que la razón de las concentraciones de estas sustancias en la orina después de seis horas será

una medida de la actividad de la enzima de interés. Conforme la concentración de dextrometorfano sea más grande eso indica que el metabolismo es más lento. Por otro lado si solo se detecta dextrorfano nos indica que el metabolismo es muy rápido y que después de unas horas solo tenemos metabolito y no sustancia activa.

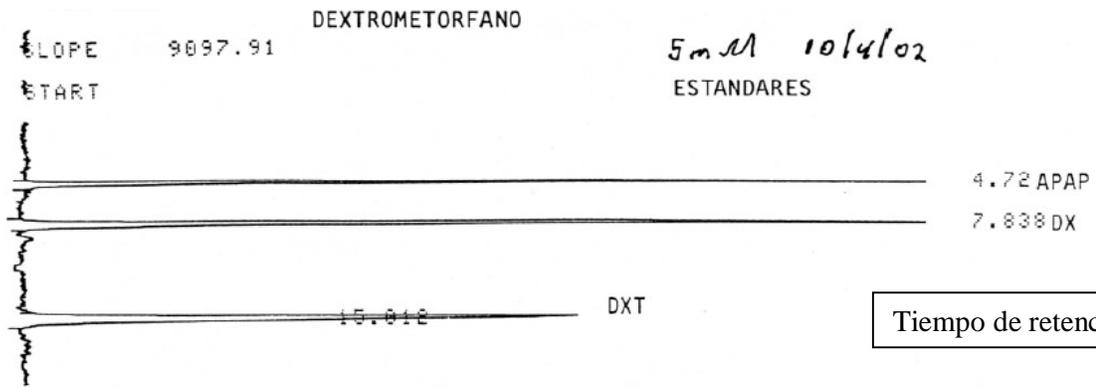
¿Cómo realizar los cálculos para el reporte?

- 1-Ponga mucha atención a las instrucciones del profesor durante la práctica
- 2-Usted recibirá cuatro cromatogramas de la práctica: un cromatograma de estándares, como el anterior, un cromatograma blanco (orina sin dextrometorfano) y dos cromatogramas de la muestra.
- 3-Utilice los tiempos de retención del cromatograma de estándares para identificar los picos en los cromatogramas muestras.
- 4-Una vez identificados los picos escriba el tiempo de retención en una tabla.
- 5-Utilice las alturas de los picos para realizar el cálculo de las concentraciones de las sustancias en la orina muestra.
- 6-Identifique las alturas en el cromatograma blanco que corresponden a las sustancias analizadas. Dicha altura de los estándares corresponde a una concentración conocida, que se indica en el cromatograma por ejemplo: $10\mu\text{M}$ o $20\mu\text{M}$.
- 7-Relacione la altura con la concentración del estándar con la respectiva altura del metabolito en el cromatograma de muestras. Utilice una regla de tres para determinar la concentración del metabolito en el cromatograma de muestras.
- 8-Con las concentraciones conocidas del dextrofano y dextrometorfano en los cromatogramas muestras utilice la razón dextrometorfano/dextrorfano para conocer la razón metabólica que determina el fenotipo metabolizador.

VÍA METABÓLICA DEL DEXTROMETORFANO



Cromatograma de estándares de concentración conocida



CHROMATOPAC C-R3A FILE 0
 SAMPLE NO 0 METHOD 1021
 REPORT NO 679

PKNO	TIME	HIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.72	77472			36.8535	
2	7.838	93642			44.5453	
3	15.012	39103			18.6012	
TOTAL		210217			100	

FLUJO 1ml/min exitación 290 nm emisión 330 nm.

Dr. González. FARMACOLOGÍA

Sustancias en el cromatograma

APAP acetaminofén

DX dextrorfanó

DXT dextrometorfanó

ESCUELA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

EVALUACIÓN DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Grupo de laboratorio _____

Fecha _____

Nombre de estudiantes:

.....
.....
.....
.....
.....

Evaluación previo al inicio de la práctica

Valor total 1% de la nota de aprovechamiento.

Dimensión I Llegada estudiantes	SI	NO	Comentario 0,1% cada ítem
Estudiantes llegan puntualmente			
Traen gabacha			
Traen anteojos de protección			
Traen el manual de la práctica en papel o medio electrónico			
Dimensión 2 Aspectos académicos	SI	NO	Comentario 0,15% cada ítem
Todos y cada uno de los estudiantes participan en las respuestas a las preguntas de la prueba oral			
Respuesta a la pregunta uno			
Respuesta a la pregunta dos			
Respuesta a la pregunta tres			
Nota parcial			

