

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología**



**Estudio del efecto de tres diferentes dosis de Tamoxifeno sobre la concentración plasmática de endoxifeno en pacientes con cáncer de mama hormonodependiente portadoras de un genotipo de CYP2D6 “metabolizador lento”.**

**Tesis Doctoral**

**José Luis Salcedo Lagullón.**

**Granada, 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: José Luis Salcedo Lagullón  
D.L.: GR 719-2013  
ISBN: 978-84-9028-432-2



**D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA,  
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que D. José Luis Salcedo Lagullón, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado ESTUDIO DEL EFECTO DE TRES DIFERENTES DOSIS DE TAMOXIFENO SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ENDOXIFENO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA HORMONODEPENDIENTE PORTADORAS DE UN GENOTIPO DE CYP2D6 “METABOLIZADOR LENTO”. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2012

**Fdo: Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla**



**D. FERNANDO BANDRÉS MOYA,  
PROFESOR TITULAR DE MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

CERTIFICA:

Que D. José Luis Salcedo Lagullón, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado ESTUDIO DEL EFECTO DE TRES DIFERENTES DOSIS DE TAMOXIFENO SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ENDOXIFENO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA HORMONODEPENDIENTE PORTADORAS DE UN GENOTIPO DE CYP2D6 “METABOLIZADOR LENTO”. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2012

**Fdo. Dr. D. Fernando Bandrés Moya**





**D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> TERESA MIRANDA LEÓN,  
PROFESORA TITULAR DE ESTADÍSTICA E INVESTIGACIÓN OPERATIVA  
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que D. José Luis Salcedo Lagullón, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado ESTUDIO DEL EFECTO DE TRES DIFERENTES DOSIS DE TAMOXIFENO SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ENDOXIFENO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA HORMONODEPENDIENTE PORTADORAS DE UN GENOTIPO DE CYP2D6 “METABOLIZADOR LENTO”. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2012

**Fdo: Prof. Dr. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Teresa Miranda**



A Lola, Lolita y Javi, mi familia



## AGRADECIMIENTOS

A los profesores María Teresa Miranda León y Fernando Bandrés Moya por su excelente disposición.

A la Dra. Mercedes Zafra Ceres por su inestimable ayuda, su apoyo y su ánimo para la realización de este trabajo.

Al profesor José Antonio Gómez Capilla por su inmensa capacidad docente, por sus buenos consejos y por su paciencia conmigo.

A Tomás de Haro Muñoz por su amistad.



## **INDICE**

---



---

## ÍNDICE

<b>Glosario de abreviaturas.</b>	23
<b>I.INTRODUCCION.</b>	
<b>I.1. Introducción al cáncer de mama.</b>	27
I. 1.1. Aspectos generales.	27
I.1.2. Epidemiología del cáncer de mama.	27
I.1.2.1. Situación epidemiológica del cáncer de mama en España	28
I.1.3. Factores de riesgo del cáncer de mama.	29
<b>I.2. Tipos de cáncer de mama.</b>	32
I.2.1. Cáncer de mama hormonodependiente.	33
<b>I.3.Tratamiento del cáncer de mama.</b>	35
I.3.1. Aspectos generales del tratamiento del cáncer de mama.	35
I.3.2. Tratamiento farmacológico del cáncer de mama.	37
I.3.2.1. Fármacos moduladores selectivos de los receptores estrogénicos.	37
I.3.2.2. Fármacos inhibidores de la aromataasa.	39
I.3.2.3. Taxanos.	41
<b>I.4. Tamoxifeno.</b>	42
<b>I.5. Farmacogenética en el tratamiento del cáncer de mama.</b>	46
I.5.1. Farmacogenética del Tamoxifeno.	48
I.5.2. Dianas de los metabolitos del Tamoxifeno.	51
I.5.3. Metabolismo de Tamoxifeno.	51
I.5.3.1. Superfamilia del citocromo P450.	52

I.5.3.2. Importancia del gen CYP2D6 en el metabolismo del Tamoxifeno.	55
I.5.3.3. Genotipos del CYP2D6 versus concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus metabolitos.	59
I.5.3.4. Inhibidores de CYP2D6.	61
I.5.3.5. Papel del CYP2C19 en el metabolismo del Tamoxifeno.	62
I.5.4. Efectos secundarios del Tamoxifeno.	62
<b>I.6. Microarrays en el cáncer de mama.</b>	<b>63</b>
<b>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.</b>	<b>67</b>
<b>III. MATERIAL Y METODOS.</b>	<b>71</b>
<b>III.1. Pacientes.</b>	<b>71</b>
III.1.1. Criterios de Inclusión y Exclusión.	71
III.1.2 Sujetos que formaran el Grupo Control.	73
<b>III.2. Cronología del estudio.</b>	<b>73</b>
<b>III.3. Tratamiento.</b>	<b>74</b>
III.3.1. Duración del Tratamiento.	74
III.3.2. Descripción del Tratamiento.	74
III.3.3. Modificación de la pauta de tratamiento.	75
<b>III.4. Desarrollo del estudio y evaluación de las variables.</b>	<b>75</b>
III.4.1. Variable principal: Comparación de los niveles plasmáticos de endoxifeno.	75
III.4.2. Variable secundaria: Confirmar niveles de endoxifeno inferiores en las “metabolizadores lentas” de CYP2D6.	76
<b>III.5. Métodos de laboratorio para la evaluación de las variables.</b>	<b>76</b>
III.5.1. Estudio del genotipo de CYP2D6.	76
III.5.1.1. Extracción del DNA.	76
III.5.1.2. Cuantificación del DNA.	78

III.5.1.3. Reactivos y consumibles empleados.	79
III.5.1.3.1. Reactivos.	79
III.5.1.3.2. Consumibles.	81
III.5.1.3.3. Materiales varios.	81
III.5.1.4. Amplificación del DNA.	84
III.5.1.4.1. Preparación de las CYP450 Working Master Mixes y el Control Positivo.	84
III.5.1.5. Fragmentación del DNA.	87
III.5.1.5.1. Preparación de la CYP450 Mezcla de Trabajo para la Fragmentación o <i>Working Fragmentation Mix</i> .	88
III.5.1.6. Marcaje con biotina.	91
III.5.1.6.1. Preparación de la mezcla de marcado o <i>Working Labeling Mix</i> .	91
III.5.1.7. Preparación de Tampón de Hibridación, Solución de Tinción y Tampón de Lavado.	93
III.5.1.7.1. Consideraciones generales.	93
III.5.1.7.2. Preparación del Tampón de Hibridación	94
III.5.1.7.3. Preparación de la Solución de Tinción.	95
III.5.1.7.4. Preparación de la Solución de Lavado.	95
III.5.1.7.5. Adición del Tampón de Hibridación a las muestras y controles. Dispensación de la Solución de Tinción.	96
III.5.1.8. Hibridación y Tinción del array.	97
III.5.1.8.1. Creación de Peticiones.	98
III.5.1.8.2. Registro de Peticiones.	99
III.5.1.8.3. Cebado de la Estación de Fluidos.	99
III.5.1.8.4. Puesta en marcha de la Estación de Fluidos.	101
III.5.1.9. Lectura del Array.	102
III.5.1.9.1. Procesamiento en el Escáner.	102
III.5.1.9.2. Visualización de los Resultados.	103
III.5.9.3. Determinación de los genotipos de CYP4502D6 y 2C19 y del fenotipo predicho.	104

III.5.1.10. Protocolo de limpieza de la Estación de Fluidos con hipoclorito sódico.	105
III.5.2. Determinación de los niveles plasmáticos de Tamoxifeno y sus metabolitos.	106
III.5.2.1. Reactivos.	107
III.5.2.2. Instrumentación.	107
III.5.2.2.1. HPLC.	107
III.5.2.2.2. Preparación de los estándares de calibración, controles de calidad y soluciones de estándares internos.	108
III.5.2.2.3. Procedimiento de validación.	109
III.5.2.2.4. Resultados y discusión.	110
<b>III.6. Método estadístico empleado.</b>	<b>111</b>
III.6.1. Estadística descriptiva.	112
III.6.2. Estadística inferencial.	112
<b>IV. RESULTADOS.</b>	<b>116</b>
<b>IV.1. Principios del ensayo.</b>	<b>117</b>
IV.1.1. Amplificación mediante PCR.	117
IV.1.1.1. Selección del objetivo.	117
IV.1.1.2. Amplificación del objetivo.	118
IV.1.1.3. Amplificación selectiva.	118
IV.1.2. Fragmentación y rotulado de los productos amplificados.	119
IV.1.3. Hibridación y tinción del microarray para AmpliChip CYP450.	119
IV.1.4. Lectura óptica del microarray para AmpliChip CYP450.	120
IV.1.5. Determinación de los genotipos de CYP4502D6 y 2C19 y del fenotipo predicho.	121
<b>IV.2. Calculo de resultados.</b>	<b>121</b>
IV.2.1. Interpretación de los resultados.	121
IV.2.1.1. Alelos de CYP2D6 investigados con la prueba AmpliChip CYP450.	122
IV.2.1.2. Actividad metabólica CYP450 2D6 predicha.	125

IV.2.1.3. Alelos de CYP2C19 investigados con la prueba AmpliChip CYP450.	126
IV.2.1.4. Actividad metabólica CYP450 2C19 predicha	126
IV.2.1.5. Alelos no detectados en nuestro estudio.	127
<b>IV.3. Resultados obtenidos en nuestro estudio.</b>	<b>128</b>
IV.3.1. Resultados en el genotipado.	128
IV.3.1.1. Resultados para el gen CYP2D6.	130
IV.3.1.1.1. Metabolizadoras eficientes para CYP2D6.	132
IV.3.1.1.2. Metabolizadoras intermedias para CYP2D6.	133
IV.3.1.1.3. Metabolizadoras pobres para CYP2D6	134
IV.3.1.1.4. Metabolizadoras ultrarrápidas para CYP2D6.	134
IV.3.1.2. Resultados para el gen CYP2C19	135
IV.3.2. Concentraciones de Tamoxifeno y sus metabolitos	136
IV.3.3. Resultado de la comparación de las concentraciones de Tamoxifeno y sus metabolitos entre el grupo control (20mg) y las pacientes metabolizadoras lentas con 20, 40 y 60 mg.	139
<b>V. DISCUSION.</b>	<b>144</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>154</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>158</b>

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**A:** Absorbancia.

**ACN:** Acetonitrilo.

**CMF:** Ciclofosfamida-Metotrexato-Fluorouracilo.

**CV:** Coeficiente de Variación.

**CYP:** Citocromo P.

**dNTPs:** deoxinucleotidos trifosfato.

**dUTP:** Trifosfato de deoxiuridina.

**EBTCG:** *Early Breast Trialists' Collaborative Group.*

**EFG:** Factor de Crecimiento Epidérmico.

**FDA:** *Food and Drug Administration.*

**IA:** Inhibidores de Aromatasa.

**Mg:** Magnesio.

**MRM:** *Multiple Reaction Monitoring.*

**NDT:** N-desmetil-tamoxifeno.

**NTP:** Nucleotido Tri Fosfato.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PPARs:** Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas.

**RE:** Receptor Estrogénico.

**RE+:** Receptor de Estrógenos Positivo.

**RPg:** Receptor de Progesterona.

**SBE:** *Single Base Extension.*

**r.p.m.:** revoluciones por minuto.

**RTI:** *Research Triangle Institute.*

**SERM:** Modulador Selectivo de Receptores Estrogenicos.

**SNPs:** *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismos de un único nucleótido).

**SSRIs (ISRS):** Inhibidores Selectivos de la Recaptacion de Serotonina.

**TAM:** Tamoxifeno.

**THDA:** Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención.

**THS:** Terapia Hormonal Sustitutiva.

**4-OH-TAM:** 4-hidroxi-tamoxifeno.

**UV:** Ultra Violeta.

**WT:** *Wild-Type*.



## **I.INTRODUCCION**

---



## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **I.1. INTRODUCCIÓN AL CÁNCER DE MAMA.**

#### **I. 1.1. Aspectos generales.**

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos de la mama. Cada mama tiene entre 15 y 20 secciones llamadas lóbulos, los cuales a su vez se dividen en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lóbulos y lobulillos se conectan por tubos delgados llamados conductos. Históricamente la primera presentación de un cáncer de mama era la presencia de un nódulo palpable o un cambio físico externo en la mama detectado por el propio paciente. En la actualidad los programas de detección precoz permiten detectar anomalías radiológicas no palpables por la mujer, que además, en muchos casos, son asintomáticas.

El cáncer intraductal, el tipo de cáncer más común del seno, se encuentra en las células de los conductos. El cáncer que se origina en los lóbulos o lobulillos se llama cáncer lobular. El cáncer lobular es el tipo de cáncer que con más frecuencia afecta a los dos senos. El cáncer inflamatorio del seno es un tipo de cáncer poco común. En esta enfermedad, el seno se observa cálido, enrojecido e hinchado.

#### **I.1.2. Epidemiología del cáncer de mama.**

El cáncer de mama femenino constituye un problema de salud pública. Esta afirmación se basa en la frecuencia de la enfermedad en el mundo así como en la repercusión que tiene en la vida de las mujeres afectadas y en los sistemas sanitarios que las atienden. Se estima que en 2002 se produjeron 1.151.298 casos nuevos en el mundo (22,7% del total de casos de cáncer estimados en mujeres para ese año). (*Ferlay et al. 2004*).

El cáncer de mama es la segunda causa por muerte a nivel mundial después del cáncer de pulmón y el tumor más frecuente en la mujer en los países desarrollados. (*Sant et al., 2009*). Las tasas de incidencia más altas se observan en Norteamérica, Australia, Países Nórdicos y Europa Occidental. Dentro de Europa la mayor incidencia corresponde a los Países Nórdicos y a los países de la Europa Occidental, mientras que es inferior en los Países del Este. España con una tasa ajustada de 93,6 casos por 100.000 mujeres año ocupa el decimoquinto lugar, en una posición intermedia entre los países occidentales y Europa del Este. Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, en 2006 se diagnosticaron unos 429.900 casos nuevos de cáncer de mama en Europa, con una tasa estandarizada de incidencia de 110 casos por 100.000 mujeres. (*Pollán et al., 2007*).

### **I.1.2.1. Situación epidemiológica del cáncer de mama en España.**

En España se estima que se diagnostican unos 20.000 casos nuevos cada año. (*Sant et al., 2009*). Es posible estimar la evolución del cáncer de mama en nuestro país a partir de la información de los registros poblacionales de Murcia, Granada, Navarra, Tarragona y Zaragoza. (*Parkin et al., 2005*). En conjunto, estos datos muestran un incremento de incidencia de un 2-3% anual. En la tendencia de cada registro se observa un pico transitorio de aumento de incidencia, particularmente marcado en Navarra, que refleja la puesta en marcha de los programas de cribado.

El incremento de la incidencia de cáncer de mama en España es de mayor magnitud que el observado en países de la Europa Occidental y Países Nórdicos, los cuales partían de incidencias más altas, por lo que las diferencias geográficas tienden a atenuarse. En algunos de estos países, como Holanda, Suiza y Reino Unido, la incidencia parece estabilizarse en los últimos años. (*Botha et al., 2003*).

El cáncer de mama supone la primera causa de muerte en intervalos de edad relativamente tempranos como el que va de los 40 a los 55 años.

La tasa de mortalidad aumenta en pacientes muy jóvenes (menos de 35 años) o en las mayores (mayores de 75 años), lo que probablemente refleja la mayor agresividad en las más jóvenes y la presencia de enfermedades concomitantes en las más mayores. (*Constanza ME., 2004*).

Se calcula que el riesgo vital de presentar cáncer de mama para una mujer española está en el 7.2%, exactamente un 57% del riesgo calculado para la población americana. Es decir, 1 de cada 12 mujeres españolas va a desarrollar un cáncer de mama

en algún momento de su vida frente a 1 de cada 6 mujeres norteamericanas. (*Ferlay et al., 2001*).

España ocupa un puesto de baja incidencia con 61.4 casos por cada 100.000 habitantes y año. El estadio de la enfermedad es uno de los factores pronostico más importantes asociados a la tasa de supervivencia. (*García et al., 2005*).

### **I.1.3. Factores de riesgo del cáncer de mama.**

Aunque la etiología del cáncer de mama es desconocida, muchos son los factores que contribuyen a aumentar el riesgo de padecer la enfermedad (Tabla 1). Las alteraciones genéticas más frecuentes que provocan la transformación y progresión maligna de las células de la glándula mamaria están relacionadas con la activación de los oncogenes, la pérdida de la función supresora del crecimiento de los genes supresoras o ambas.

**Tabla 1.** Factores de riesgo en el cáncer de mama.

<b>Gran incremento del riesgo</b>
Edad
Sexo femenino
Historia familiar y personal de cáncer de mama
Síndromes genéticos que predisponen al cáncer de mama
Hiperplasia atípica de la mama
Radiaciones ionizantes
<b>Incremento moderado del riesgo</b>
Menarquía temprana
Menopausia precoz
Nuliparidad
Primer hijo a término > 30 años
Estatus socioeconómico alto
Consumo de alcohol
Obesidad en postmenopausicas
Patrones monográficos parenquimatosos desfavorables
Hiperplasia benigna de la mama sin atipia
Uso de anticonceptivos
Terapia hormonal sustitutiva
Tabaco

Solo el 5-10% de los casos de cáncer de mama se relacionan con genes de susceptibilidad siendo los más frecuentes BRCA-1 y BRCA-2. El BRCA-1 es un gen supresor localizado en el cromosoma 17 que confiere una probabilidad de desarrollar cáncer de mama de un 85% a lo largo de la vida. (*Struewing et al., 1997*). El BRCA-2 se localiza en el cromosoma 13 y parece cumplir funciones supresoras. Confiere una probabilidad de desarrollar cáncer de mama similar al BRCA-1.

Otros genes cuya mutación se asocia al cáncer de mama son el p53 (asociado al síndrome de Li-Fraumeni), el gen AT de la ataxia-teleangiectasia, el H-ras 1 y el PTEN/MMAC relacionados estos dos últimos con el síndrome de Cowden. (*Hartmann et al., 1997*).

Por otro lado la sobreexpresión de ciertos oncogenes conlleva un exceso en la síntesis de factores de crecimiento y/o de sus receptores lo que provoca alteraciones en el crecimiento celular que pueden desencadenar la aparición de alteraciones proliferativas tanto benignas como malignas. (*Fernández-Santander et al., 2007*). Se han identificado varias familias de factores de crecimiento implicadas en el cáncer de mama. La más estudiada es la relacionada con los factores de crecimiento epidérmico (EFG). Varios fármacos utilizan esta diana para bloquear el crecimiento de la célula. El oncogén erbB-2/neu se expresa a muy bajas concentraciones en las células normales pero también se ha observado amplificado en el 30% de los cánceres de mama, pareciendo correlacionar con diagnóstico severo. (*García et al., 2005*).

Existen suficientes evidencias epidemiológicas y experimentales que involucran a los estrógenos en la etiopatogenia de la enfermedad. La presentación casi exclusivamente femenina y el mayor riesgo de las mujeres más mayores apuntan como factor de riesgo importante la dosis acumulativa de estrógenos a la que es sometido el epitelio mamario a lo largo del tiempo. Algunos estudios han puesto de manifiesto que las mujeres postmenopausicas que desarrollan un cáncer de mama exhiben unos niveles medios de estrógenos circulantes unos 15% superiores a las mujeres que no lo desarrollan. (*Thomas et al., 1997*). La actividad hormonal endógena es la más importante desde el punto de vista patogénico estando la duración del periodo fértil directamente correlacionada con el riesgo de cáncer de mama. El uso terapéutico de estrógenos exógenos está desempeñando un papel muy relevante. Los datos sobre la asociación entre el cáncer de mama y la terapia hormonal sustitutiva (THS) son controvertidos por lo que la THS solo parece indicada en aquellos casos donde el riesgo de inducir un cáncer de mama sea contrapesado por el beneficio aportado por dicho tratamiento.

En cuanto a los receptores de estrógenos, el 70% de las neoplasias mamarias expresan el tipo alfa denominándose *cáncer de mama receptor de estrógenos positivo* (RE+), siendo un factor pronóstico reconocido, así como un factor predictivo de respuesta a tratamiento hormonal, bien mediante el bloqueo de la unión del ligando al receptor (Tamoxifeno y análogos), anulación funcional del mismo (inhibidores de la aromatasa y análogos) o su destrucción estructural (Sulvestran).

## **I.2. TIPOS DE CÁNCER DE MAMA.**

Existen dos tipos principales de cáncer de mama:

- El carcinoma ductal que comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón. La mayoría de los cánceres de mama son de este tipo.
- El carcinoma lobulillar comienza en partes de las mamas, llamadas lobulillos, que producen leche.

En raras ocasiones, el cáncer de mama puede comenzar en otras áreas de la mama.

El cáncer de mama puede ser invasivo o no. Invasivo significa que se ha propagado desde el conducto galactóforo o lobulillo a otros tejidos en la mama. No invasivo significa que aún no ha invadido otro tejido mamario. El cáncer de mama no invasivo se denomina *in situ*.

- El carcinoma ductal *in situ* (CDIS), o carcinoma intraductal, es un cáncer de mama en el revestimiento de los conductos galactóforos que todavía no ha invadido tejidos cercanos. Sin tratamiento, puede progresar a cáncer invasivo.
- El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) es un marcador del aumento del riesgo de cáncer invasivo en la misma o ambas mamas.

Muchos cánceres de mama son sensibles a las hormonas estrógenos, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor canceroso mamario crezca. Tales cánceres tienen receptores de estrógeno en la superficie de las células y se denominan cáncer positivo para receptores de estrógenos o cáncer positivo para RE.

Algunas mujeres tienen lo que se conoce como cáncer de mama positivo para HER2. HER2 se refiere a un gen que ayuda a que las células crezcan, se dividan y se reparen ellas mismas. Cuando las células tienen demasiadas copias de este gen, las células (incluyendo las cancerosas) se multiplican más rápidamente. Los expertos piensan que las mujeres con cáncer de mama positivo para HER2 tienen una enfermedad más agresiva y un riesgo mayor de que la enfermedad reaparezca (recurrencia) que las mujeres que no tienen este tipo de cáncer.

En los últimos años, y especialmente en las mujeres de edades comprendidas entre los 40 y 69 años, se está constatando un aumento en la incidencia de carcinomas mamarios hormonodependientes, así como de los tumores receptor de estrógenos positivos y receptor de progesterona negativos (RE+/RP-). Los primeros, parecen ser consecuencia de numerosas causas, mientras que estos últimos son debidos, entre otros factores, a la pérdida con la edad de la función de la Sp1, con capacidad de unión al ADN y esencial para la expresión del receptor de progesterona inducida por el de estrógeno, así como al aumento de P-Erk5, marcador del estrés oxidativo.

### **I.2.1. Cáncer de mama hormonodependiente.**

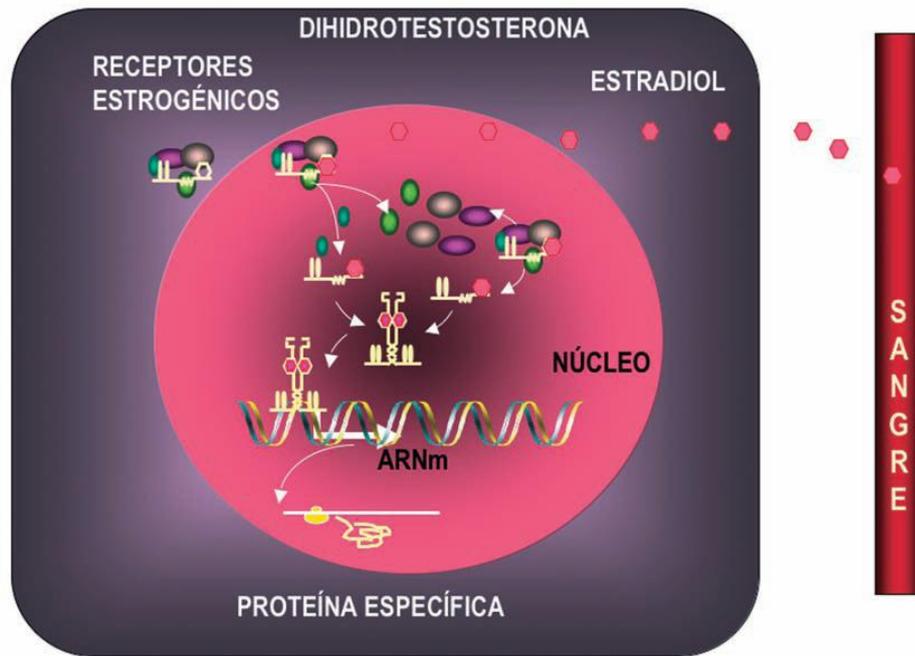
La fisiología de la mama sana se caracteriza por una dependencia hormonal muy acusada: los estrógenos actúan en la diferenciación y el crecimiento de la mama; la progesterona en la diferenciación de los acinos y en su aumento de volumen; la prolactina convierte la mama en una fábrica productora de leche, que la oxitocina pone a disposición del bebé que la succiona. Se considera que la capacidad de los estrógenos para inducir proliferación celular en el tejido mamario es una de las causas que promueven carcinogénesis mamaria. Por ello, cuando se habla de dependencia hormonal del cáncer de mama, se alude generalmente a la dependencia estrogénica. (*Clark., 2001; Clemons et al., 2001*).

En la mama se encuentran dos tipos de receptores estrogénicos (RE):  $\alpha$  y  $\beta$ . El RE  $\beta$  parece tener una función más diferenciadora en el tejido mamario que el RE  $\alpha$  al que se atribuye la función proliferativa. Existe una evidencia creciente de que la expresión de RE  $\beta$  en tumores disminuye en relación con el tejido sano en mama, endometrio, colon y próstata. La pérdida de RE  $\beta$  se especula que puede estar relacionada con la desdiferenciación del tejido, y que puede representar un estado crítico en la progresión de los tumores dependientes de estrógenos (*Bardin et al., 2004*).

La molécula de receptor, es una proteína que interactúa directamente con la hormona. Está formada por una sola cadena polipeptídica tanto en el RE  $\alpha$  como en el RE  $\beta$  al igual que en el resto de receptores nucleares. (*Green et al., 1986; Kuiper et al., 1996*). El RE  $\alpha$  tiene 565 aminoácidos siendo de mayor tamaño que el RE  $\beta$  que cuenta con 530 aminoácidos. Los receptores estrogénicos son factores de transcripción génica, que se activan mediante una unión de alta afinidad con un ligando (hormona o anti-

hormona), que transforma el receptor desde un estado nativo, que es genéticamente inactivo, a un estado activado, capaz de identificar los genes susceptibles de responder específicamente a cada receptor. (*Kouse et al., 1999*). El estradiol entra sin aparente dificultad a través de la membrana plasmática a favor de gradiente de concentración. La hormona se une al receptor, proteína soluble del citosol celular que, en ausencia de hormona, se encuentra asociado a otras proteínas (hsp 90 y otras) que lo mantienen en estado inactivo. (Figura 1). La unión hormona-receptor hace que se separen las otras proteínas, y que se forme un dímero de receptor unido a estradiol, que constituye su forma activa. El dímero del receptor es capaz de reconocer los genes dependientes de estrógenos y activar su expresión. Como resultado aparecen en la célula proteínas específicas, como los factores de transcripción *c-myc*, *c-fos* o receptor de progesterona, que activan la expresión de otros genes y, eventualmente, conducen a la célula a iniciar el ciclo celular.

La organización funcional de los receptores estrogénicos se lleva a cabo a través de estructuras concretas de la molécula del receptor, denominadas dominios moleculares. Los dominios se forman mediante plegamientos de la molécula, que le permiten alcanzar la estructura espacial (terciaria) adecuada para realizar cada función. Los receptores estrogénicos tienen dominios de localización nuclear, de unión a la hormona, de dimerización, de unión al ADN y de activación de la transcripción. El reconocimiento de cada receptor por su respectiva hormona es un proceso altamente específico en el que la pequeña molécula hormonal entra en una cavidad hidrofóbica de la molécula del receptor, formando una unión de alta afinidad con el dominio de unión a la hormona. Esto produce un cambio conformacional en la estructura tridimensional del receptor, que es clave para los pasos posteriores en la acción hormonal.



**Figura 1.** Mecanismo general de acción de los estrógenos.

### **I.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.**

#### **I.3.1. Aspectos generales del tratamiento del cáncer de mama.**

El tratamiento del cáncer de mama se basa en muchos factores incluyendo el tipo y estadio de cáncer, si el cáncer es sensible o no a ciertas hormonas o si el cáncer produce en exceso o no el gen HER2/neu.

En los últimos años ha sido objeto de análisis y debate la enorme variabilidad individual existente en la eficacia y toxicidad de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama.

Aunque factores personales como la dieta, la edad, el sexo o la medicación concomitante, así como otras variables ambientales, han sido asociados a la respuesta a fármacos diferencias genéticas interindividuales en el transporte, metabolismo y dianas de

ciertas drogas que pueden tener una enorme influencia sobre el éxito o no de un tratamiento determinado. (*Evans et al., 2003; Waters et al., 2002*).

La terapia dirigida, también llamada terapia biológica, es un tipo de tratamiento para el cáncer. Esta terapia utiliza fármacos antineoplásicos especiales que focalizan ciertos cambios en una célula que pueden llevar al cáncer. Uno de estos fármacos es *trastuzumab* (Herceptin) y se puede utilizar para mujeres con cáncer de mama positivo para HER2.

La mayoría de las mujeres recibe una combinación de tratamientos. Para las mujeres con cáncer de mama en estadio I, II o III, el objetivo principal es tratar el cáncer e impedir que reaparezca (curarlo). Para las mujeres con cáncer en estadio IV, el objetivo es mejorar los síntomas y ayudar a que las personas vivan por más tiempo. En la mayoría de los casos, el cáncer de mama en estadio IV no se puede curar. (*Chlebowski et al., 2009*).

- Estadio 0 y carcinoma ductal *in situ* (CDIS): el tratamiento estándar es la tumorectomía más radiación o la mastectomía. Existe alguna controversia acerca de la mejor manera de tratar el CDIS. (*Carlson et al., 2009*)
- Estadio I y II: el tratamiento estándar es la tumorectomía más radiación o la mastectomía con algún tipo de extirpación de ganglios linfáticos. Igualmente, se pueden recomendar la hormonoterapia, la quimioterapia y la terapia biológica después de la cirugía.
- Estadio III: el tratamiento involucra cirugía posiblemente seguida de quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica.
- Estadio IV: el tratamiento involucra cirugía, radiación, quimioterapia, hormonoterapia o una combinación de estos tratamientos.

### I.3.2. Tratamiento farmacológico del cáncer de mama.

#### I.3.2.1. Fármacos moduladores selectivos de los receptores estrogénicos.

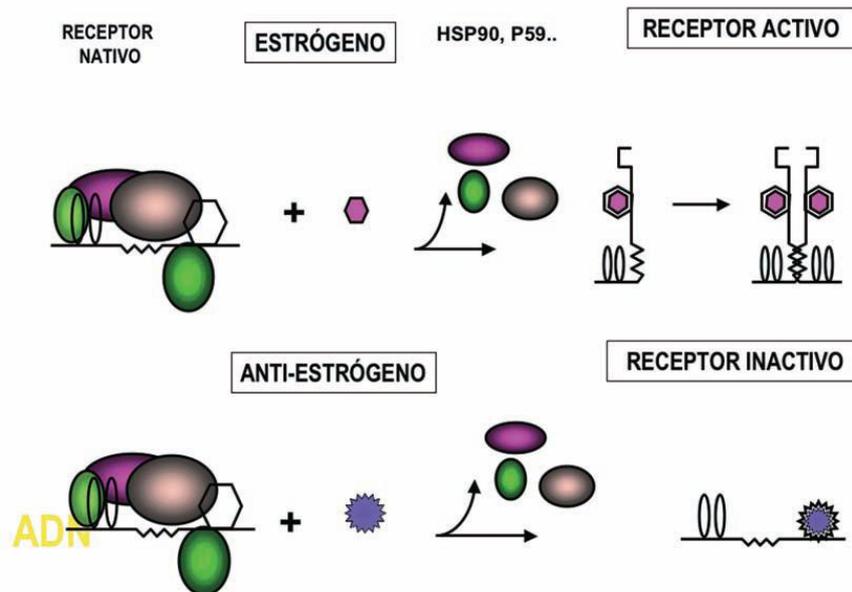
El receptor estrogénico (RE) es un factor nuclear estimulado por ligandos, responsable de los efectos biológicos de los esteroides hormonales estrogénicos. El receptor estrogénico pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que incluyen los receptores esteroídicos, los receptores retinoicos, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARS) y otros muchos aún no identificados. Todos estos receptores nucleares muestran un alto grado de homología y son activados por moléculas pequeñas, de carácter lipófilo, que se unen a los mismos en un área hidrofóbica específica para cada ligando.

Se conocen tres tipos de receptores estrogénicos, las formas RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RE $\gamma$  (o ERb2), siendo los dos primeros los más estudiados. El RE $\alpha$ , clonado de células MCF-7 procedentes de un tumor de mama humano, es una proteína que contiene 595 aminoácidos y un peso molecular de 66 kDa. Está codificado por un gen localizado en el cromosoma 6. El RE $\beta$ , fue clonado a partir de células de próstata de rata y un peso molecular de 53 kDa. El gen que expresa el RE $\beta$  humano se localiza en el cromosoma 14, expresándose en una amplia variedad de tejidos, incluyendo los cardiovasculares, los riñones, los pulmones, el cerebro y el sistema nervioso central. Las diferencias estructurales entre ambos tipos de receptores hace posible el diseñar ligandos que se unan selectivamente a uno u otro, constituyendo la base molecular del concepto de los moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERMs).

Funcionalmente, los receptores RE $\alpha$  y RE $\beta$  pueden ser divididos en 5 regiones. Ambos muestran una elevada afinidad hacia los estrógenos y una considerable homología en la región donde se unen al DNA. Desde el punto de vista farmacológico, el **dominio de unión de ligandos**, que muestra una homología del 60%, es el que más interesa ya que es la zona del receptor donde se fijarán de forma más o menos selectiva y con mayor o menor afinidad las diferentes moléculas ya sean estrógenos puros o moduladores selectivos.

La estructura del dominio de unión de ligandos de ambas isoformas del RE ha sido totalmente dilucidada, lo que permite explicar las interacciones que tienen lugar

entre agonistas, agonistas parciales, moduladores selectivos y antiestrógenos esteroídicos (antagonistas puros) y, lo que es más importante, diseñar nuevos fármacos que actúen selectivamente. Los receptores estrogénicos tienen capacidad para interactuar con diferentes ligandos, dando lugar a conformaciones espaciales del receptor muy diferentes. (Figura 2). Algunas conformaciones, como la producida por el estradiol, dan lugar a dímeros activos, capaces de activar plenamente la expresión de genes dependientes de estrógenos. La unión con otros ligandos, como los antiestrógenos puros, dan lugar a estructuras incapaces de formar dímeros, o a formar dímeros incapaces de activar la expresión génica. El resultado es que los antiestrógenos reclutan los receptores y los inactivan para su función.



**Figura 2.** Interacción del receptor estrogénico con diferentes ligandos. (Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC., 2006).

Además, los avances realizados en los últimos años en la dilucidación del mecanismo de acción de los receptores estrogénicos han permitido descubrir inhibidores del receptor estrogénico que no se unen al mismo en el dominio de unión de ligandos.

En efecto, los diferentes estados conformacionales adoptados por el RE en presencia de diferentes ligandos influyen directamente sobre la actividad transcripcional regulando la unión a esta parte de la molécula de cofactores e indirectamente modulando

la estabilidad del receptor. (Figura 2) Se han identificado péptidos capaces de actuar sobre las interacciones receptor-cofactor, capaces de inhibir la actividad transcripcional del receptor. Esta posibilidad de interaccionar fuera del dominio de unión de ligandos también explicaría la resistencia al Tamoxifeno que se observa después de un tratamiento prolongado. En este caso, se formaría en la región del dominio de unión de ligandos una nueva cavidad que permitiría el reclutamiento de los cofactores, incluso estando fijado el Tamoxifeno al receptor, lo que hace que el antiestrógeno se transforme en estrógeno en lo que respecta a la respuesta celular. La importancia de este descubrimiento es obvia, ya que permite el diseño de fármacos que eviten la formación de esta cavidad de resistencia en la superficie del receptor. (*Katzenellenbogen et al., 2004; Hanstein et al., 2004*).

La acumulación de conocimientos sobre la estructura y función de los receptores estrogénicos conseguida en los últimos años, ha permitido el diseño varios tipos de compuestos que interfieren con ellos. En este sentido podemos distinguir:

I) Fármacos moduladores propiamente dichos (SERM): Son compuestos no esteroideos que se unen a los receptores de estrógenos y actúan como agonistas en algunos tejidos pero, en cambio, como antagonistas en otros tejidos. Dentro de ellos distinguimos dos familias de fármacos:

a) Trifeniletílenos: Clomifeno, *Tamoxifeno*, Toremifeno.

b) Benzotiofenos: Raloxifeno.

El mecanismo de acción de ambas familias se basa en que los distintos complejos ligando-receptor afectaran de forma diferente a la transcripción génica en los distintos tejidos de manera que en determinados tejidos inducen la síntesis de proteínas mientras que en otros la inhiben.

II) Antagonistas puros de los estrógenos: Fulvestrant: el enlace de este fármaco con los receptores estrogénicos impide la dimerización de estos, de manera que bloquea la transcripción dependiente de estrógenos. (*Flórez et al., 2003*).

### **I.3.2.2. Fármacos inhibidores de la aromatasa.**

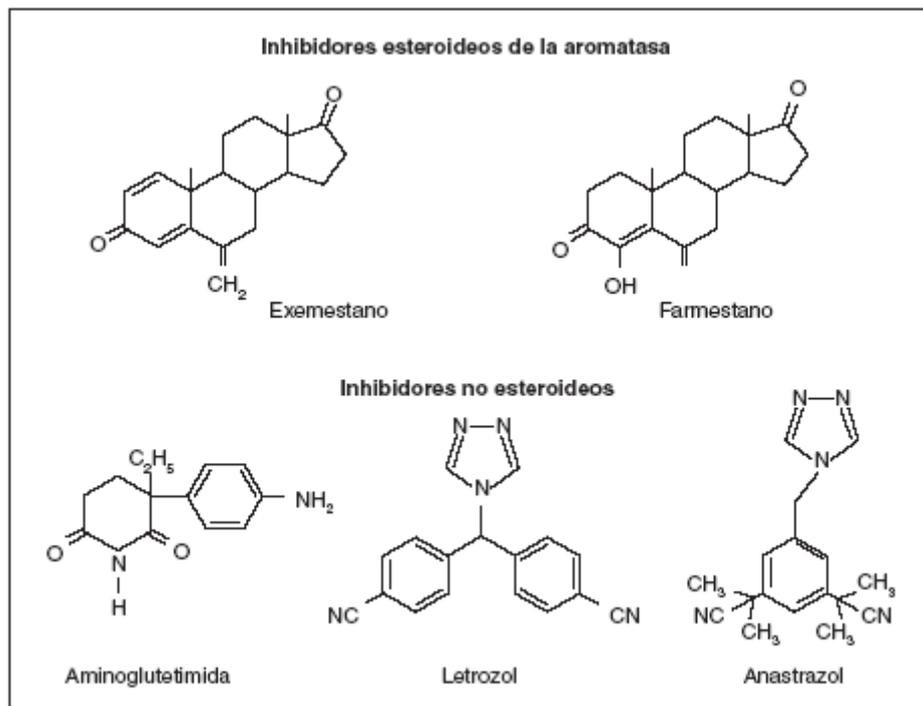
La aromatasa es un complejo sistema enzimático que transforma los andrógenos testosterona u androstendiona en estradiol y estrona respectivamente. La enzima está presente en el tejido mamario entre otros. Cuando se desea suprimir totalmente la

existencia de estrógenos es preciso bloquear también esta vía de síntesis estrogénica.

Existen dos tipos de inhibidores específicos de la aromatasa:

a) Inhibidores esteroideos o tipo I: Son inhibidores irreversibles de la enzima con la que forman una unión covalente: Formestano (1ª Generación), exemestano (2ª Generación), atamestano (3ª Generación). (Figura 3).

b) Inhibidores no esteroideos o tipo II: son inhibidores reversibles: Glutetimida (1ª Generación), fadrozol (2ª Generación), anastrozol (3ª Generación). (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura química de los Inhibidores de la aromatasa.

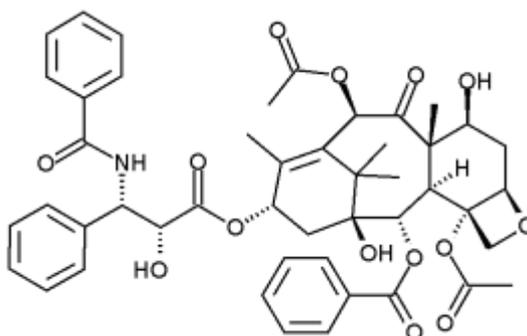
En ambos casos producen descensos sustanciales en los niveles de estrógenos del orden del 80%. En pacientes con un riesgo elevado de padecer cáncer de mama así como en aquellas pacientes donde la enfermedad se encuentra avanzada los inhibidores de la aromatasa han demostrado buenos resultados. (Cuzick., 2005). En los últimos años estos fármacos se han mostrado como una alternativa razonable, con eficacia demostrada en pacientes que han cumplido el ciclo de 5 años de tratamiento con Tamoxifeno (Goss et al., 2003) e incluso tan solo con 2-3 años. (Coombes et al., 2004).

### I.3.2.3. Taxanos.

Durante décadas las combinaciones tipo CMF (ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracilo) han sido la base del tratamiento del cáncer de mama metastásico. La inclusión de antraciclinas y más recientemente de los taxanos hacen que estos ocupen hoy en día la primera línea en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. (Nabholtz y Gligorov., 2005).

Paclitaxel es un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer. Fue descubierto por el *Research Triangle Institute* (RTI) en 1968 cuando Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani aislaron el compuesto que se encuentra en la corteza del Tejo del pacifico, *Taxus brevifolia*, y observaron su actividad antitumoral en un amplio rango de tumores. En 1970, los dos científicos determinaron la estructura del Paclitaxel. (Figura 4). El paclitaxel es un diterpeno cíclico derivado del núcleo del taxano. Posee un anillo oxetano de cuatro miembros y una cadena amídica, la cual al modificarse da lugar al docetaxel. Desde su descubrimiento, los taxanos han sido una herramienta muy efectiva para el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama, y formas avanzadas del Sarcoma de Kaposi.

Tanto paclitaxel como docetaxel actúan en los microtubulos del huso mitótico, favoreciendo su polimerización, pero estabilizándola e impidiendo su despolimerización, lo que conduce a la muerte celular induciendo una parada del ciclo celular en la fase G2.



**Figura 4.** Estructura química del Paclitaxel.

En los últimos años ha cobrado un enorme interés el uso de paclitaxel con anticuerpos monoclonales como trastuzumab. La sobreexpresión del gen Her-2neu presente en un 20% - 30% de los casos de cáncer de mama constituye un factor pronóstico desfavorable pero también una diana terapéutica en tumores que amplifican la proteína codificada por el gen. El Her-2neu es una glicoproteína transmembrana que forma parte de la familia c-erbB y que posee actividad tirosin-quinasa. El trastuzumab se une a un epítipo concreto de la proteína Her2-neu, y cuya interacción supone la inhibición de la señal de transducción intracelular inducida por los factores de crecimiento. Esta inhibición de señalización intracelular supone el cese de la proliferación celular y la disminución del potencial maligno tumoral. Las pacientes tratadas con trastuzumab han presentado más respuestas, más duración de las respuestas, mejor tiempo hasta la progresión y mayor calidad de vida, pero a expensas de un aumento de la cardiotoxicidad, hecho que ha sido contrarrestado con el uso combinado de taxanos. (Rodríguez., 2005).

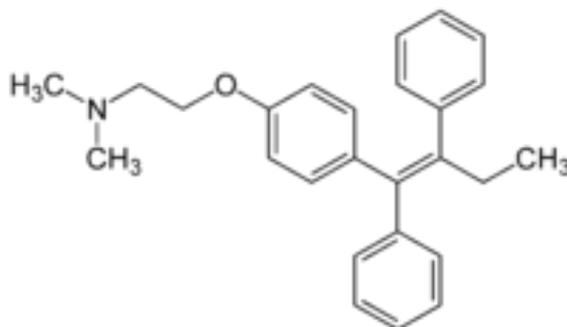
#### **I.4. TAMOXIFENO.**

El Tamoxifeno (TAM) es un modulador selectivo del receptor de estrógenos que está siendo usado comúnmente durante las dos últimas décadas en el tratamiento y prevención del cáncer de mama receptor de estrógenos positivo. (Osborne., 1998). Tiene una eficacia demostrada en la reducción del riesgo del cáncer de mama del 50%. (Vogel et al., 2006). Ya en 1998 la FDA (*Food and Drug Administration*) americana aprobó el uso del TAM para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. (Fisher et al., 1998). El Tamoxifeno actúa como antiestrogénico en el tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos, hormonas femeninas que promueven el crecimiento de las células cancerosas de la mama. Debido a su efecto agonista parcial, TAM ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo. Su uso durante 5 años en dosis de 20 mg/día es la pauta considerada estándar.

Su eficacia ha quedado reafirmada tras los resultados publicados recientemente por el "*Early Breast Trialists' Collaborative Group*" (EBTCG) en el que tras un meta-análisis con 194 estudios comparativos como tratamiento adyuvante, se ha objetivado una reducción del riesgo de muerte anual por carcinoma de mama en el 31% de las pacientes con RE-positivos que reciben Tamoxifeno así como una reducción a casi la mitad de la tasa de recaídas, independientemente de la edad de la paciente, del valor de los receptores hormonales o de la exposición previa a la quimioterapia.



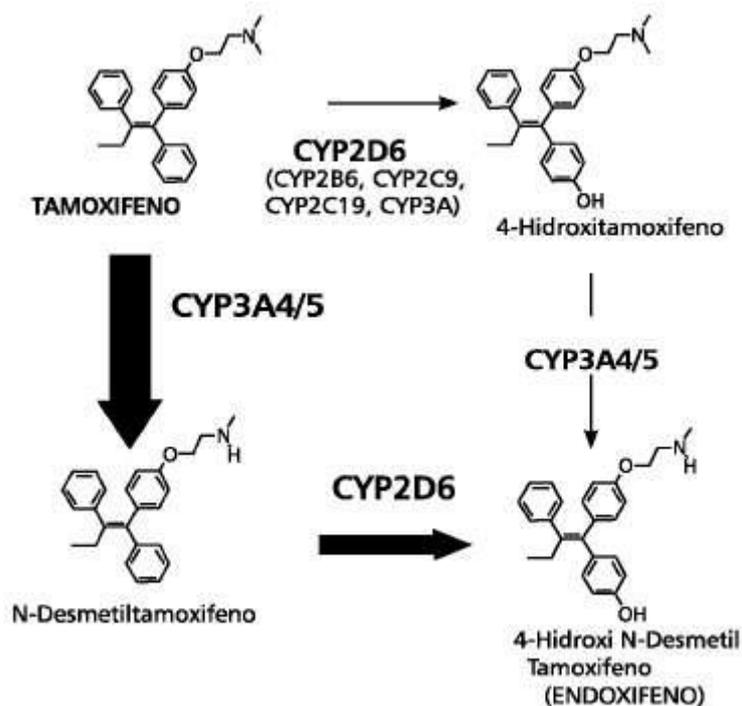
**Figura 5.** Molécula de Tamoxifeno.



**Figura 6.** Estructura química del Tamoxifeno.

A pesar de la introducción de los inhibidores de aromatasas (IA) en el tratamiento del cáncer de mama, TAM continúa siendo el tratamiento hormonal de elección para el cáncer de mama invasivo RE-positivo en pacientes premenopáusicas, para el carcinoma ductal *in situ* y como quimiopreventivo en mujeres sanas de alto riesgo de cáncer de mama. Además, en pacientes postmenopáusicas todavía se usa con frecuencia como terapia adyuvante en esquemas secuenciales con los IA, y en los estadios avanzados de la enfermedad tras fracaso a los IA. (*Burstein et al., 2010*).

Sin embargo, la respuesta clínica del Tamoxifeno es variable y entre un 30 y un 50% de las pacientes que reciben tratamiento adyuvante con Tamoxifeno padecen una recaída y posteriormente mueren de la enfermedad (EBTCG). La determinación de los determinantes de esta variabilidad es importante, especialmente en la era de la medicina personalizada. Es ampliamente conocida la conversión en el organismo de Tamoxifeno en una serie de metabolitos con una actividad antiestrogénica mucho mayor que la del propio TAM el cual es metabolizado en las células del hígado para producir tres metabolitos principales distintos: 4-hidroxi-TAM, N-desmetil-TAM y 4-hidroxi-N-dimetil-TAM. (Figura 7). Tanto el 4-hidroxi-tamoxifeno como el 4-hidroxi-N-dimetil-tamoxifeno o *endoxifeno*, juegan un importante papel en la actividad antitumoral de TAM dada su mayor afinidad (x100) por el receptor estrogénico y su mayor potencia (x30-100) para inhibir la proliferación celular estrógeno-dependiente con respecto al fármaco de origen. (*Borgna et al., 1981. Coezy et al., 1982*). Recientes estudios sugieren que endoxifeno es el metabolito activo más importante por su contribución relativa al efecto antitumoral de TAM, ya que aunque su potencia es similar al 4-hidroxitamoxifeno, su concentración plasmática de equilibrio es de 6 a 10 veces mayor que este (*Jins et al., 2005*) y además parece degradar al RE. (*Wu et al., 2009*).



**Figura 7.** Principales metabolitos del Tamoxifeno.

Tanto la molécula de Tamoxifeno como sus tres metabolitos son considerados SERMs (*selective estrogen receptor modulator*) es decir, moduladores selectivos de receptores estrogénicos debido a su capacidad para unirse a receptores de estrógenos en el ADN. En estudios *in vivo* se ha comprobado que los SERMs compiten con los estrógenos para unirse a sus receptores dando como resultado una atenuación en la respuesta celular mediada por estrógenos. (Beverage *et al.*, 2007). Se ha demostrado que tanto la eficacia como la toxicidad del Tamoxifeno varían enormemente entre individuos debido a que el metabolismo del TAM presenta una gran variabilidad interindividual.

## **I.5. FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.**

La farmacogenética se encarga del estudio de la variabilidad individual en la respuesta a los fármacos, según las características genéticas de cada persona. Las terapias farmacogenéticas son tratamientos individualizados, que intentan minimizar la resistencia y la toxicidad de los fármacos a la vez que maximizan la respuesta de los pacientes.

La secuenciación completa del genoma humano ha acelerado en los últimos años la identificación de variantes en las secuencias de ADN, comúnmente llamadas polimorfismos. Un polimorfismo se define como un locus, donde dos o más alelos están presentes en la población con una frecuencia mayor del 1%. Variaciones a nivel de ADN son las responsables de la diferente respuesta que presentan distintos pacientes ante un mismo fármaco, lo cual plantea la alternativa de poder a cabo un estudio genético previo a la selección del tratamiento más eficaz.

Los polimorfismos denominados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) o polimorfismos de un solo nucleótido son los que presentan una mayor variación en el genoma humano. Aproximadamente el 90% de la variabilidad genética humana es atribuible a los SNPs, mientras que el resto se debe fundamentalmente a inserciones, deleciones, repeticiones en tándem y microsatélites. Los SNPs son muy numerosos, estables y están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Estos polimorfismos se consideran de gran interés ya que generan diferencias en la estructura de la proteína, provocando el desarrollo de enfermedades y la aparición de fenotipos diferentes. (*Zhao y Boerwinkle., 2002*).

Además los SNPs han contribuido satisfactoriamente en la identificación y caracterización de mutaciones implicadas en la determinación de determinados trastornos genéticos así como en la identificación de individuos portadores de las mismas. (*Risch y Merikangas., 1996*).

Hoy en día existen tecnologías sofisticadas basadas en microchips que permiten un diagnóstico *in vitro* que proporciona un genotipado individual de alta fiabilidad. Actualmente han sido identificados más de cinco millones de SNPs por parte de consorcios públicos y privados. El interés por la investigación en este campo parece lógico, ya que se ha demostrado que ciertos polimorfismos pueden informar al investigador de forma directa o indirecta acerca de cómo predecir tanto la respuesta como la toxicidad de los agentes quimioterápicos.

Mediante la potencial identificación de pacientes con riesgo de toxicidad severa o de aquéllos que se beneficiarán de la terapia, los clínicos serán capaces de individualizar los tratamientos para el cáncer. Sin olvidarnos de la influencia de factores no genéticos, se ha estimado que la herencia genética podría explicar del 20% al 95% de la variabilidad individual en la respuesta a un fármaco. (*Raña et al., 2006*).

Los tratamientos sistémicos para el cáncer de mama pueden dividirse en terapia hormonal, quimioterapia y terapias dirigidas. La actividad antitumoral o la seguridad de agentes específicos puede depender no sólo de la dosis de la droga o del régimen de utilización, sino también de dianas funcionales, enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores. Asimismo, algunos agentes actúan como profármacos, con uno o más metabolitos, que pueden contribuir a la actividad antitumoral del fármaco o a efectos secundarios específicos. La determinación prospectiva de las variantes genéticas de enzimas metabolizadoras, transportadores o dianas de fármacos, podría emplearse para determinar la posibilidad de respuesta y/o propensión a efectos adversos. (*Raña et al., 2006*).

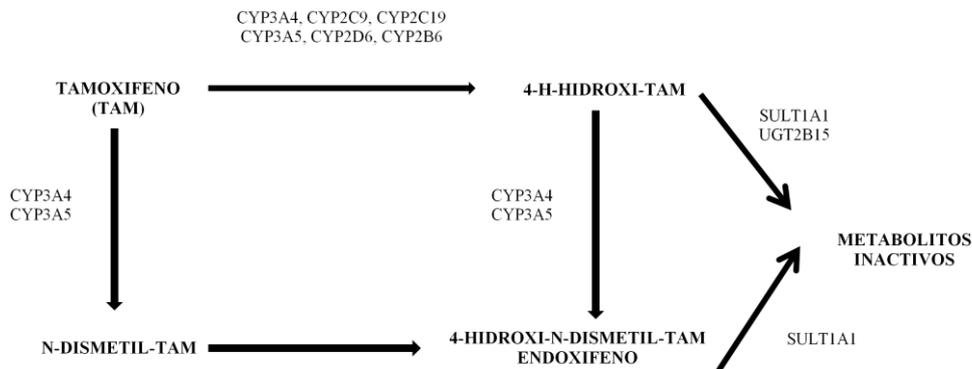
Dentro de los diferentes tratamientos aplicados hoy en día a los casos de cáncer de mama, el uso de antiestrógenos (Tamoxifeno) e inhibidores de la aromatasas (anastrozol, exemestán, letrazol) están indicados para los tumores localizados y que son positivos para los receptores de estrógenos. (*Carpenter y Miller., 2005*). En el caso de aquellos más avanzados o que presentan metástasis el uso de quimioterapia citotóxica, incluidos los taxanos (paclitaxel y docetaxel) parece más indicado. (*Nabholtz y Gligorov., 2005*).

Esta variedad de tratamientos plantea la necesidad de llevar a cabo un estudio del paciente previo a la selección del tratamiento, en el cual la farmacogenética se revela como una alternativa de enorme interés. (*Marsh y McLeod., 2007*).

Por ello, esta tesis doctoral se va a centrar en el fármaco Tamoxifeno ya que es uno de los más extensamente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama y, como ha sido ampliamente demostrado, las diferencias genéticas interindividuales provocan una eficacia del tratamiento y un beneficio para la mujer que puede variar de unas pacientes a otras. En cualquier caso un *screening* genético previo sería de enorme interés para decidir en cada caso el tratamiento más apropiado, entrando de lleno en lo que se ha venido denominando la era de la medicina personalizada.

### I.5.1. Farmacogenética del Tamoxifeno.

En la figura 8 se resume cuales son los principales genes implicados en la transformación de Tamoxifeno en sus metabolitos secundarios. La mayoría de estos genes pertenecen a la familia del citocromo P450, la cual engloba un grupo muy variado de enzimas con diferentes subfamilias y con funciones muy diversas como, por ejemplo, la función detoxificadora. La transformación inicial a Tamoxifeno puede producirse mediante dos vías: (1) la conversión de TAM en N-desmetil-TAM metabolizado por los genes CYP3A4 y CYP3A5 y (2) la formación de 4-hidroxi-TAM gracias a la participación de CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19 y CYP2B6. (Rewe *et al.*, 1997). Aunque el metabolismo de TAM a 4-OH-Tamoxifeno es catalizado, como se ha dicho, por múltiples enzimas la formación de endoxifeno se produce predominantemente por la enzima P450-CYP2D6 mediante la oxidación de N-desmetil-Tamoxifeno, que es el metabolito más abundante de TAM. (Desta *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Principales vías del metabolismo del Tamoxifeno.

Los polimorfismos del citocromo P450 son frecuentes en la población general. Hasta la fecha se han identificado aproximadamente un centenar de polimorfismos en el gen CYP2D6 dando lugar a diferencias en su capacidad metabólica. Un SNP funcional en

el CYP2D6 u otro enzima CYP, podría influir en la concentración relativa de cada metabolito del Tamoxifeno. Se ha sugerido que el 4-hidroxitamoxifeno, que es 100 veces más potente que el Tamoxifeno en términos de unión al RE, podría jugar un papel fundamental en la actividad antitumoral del Tamoxifeno (*Smith et al., 2003*).

Datos más recientes, sugieren que otros metabolitos podrían ser tan importantes como el 4-hidroxitamoxifeno en la actividad del Tamoxifeno y que éstos podrían estar influidos por efectos farmacogenéticos. Mujeres con polimorfismos en el CYP2D6, tuvieron concentraciones significativamente menores del metabolito endoxifeno, en comparación con las mujeres que tenían el genotipo normal "*wild-type*" (WT). (*Goss et al., 2003*). En un ensayo prospectivo más extenso de mujeres que tomaban Tamoxifeno, a las que se estudió el CYP2D6, las que tenían variantes alélicas funcionales, tuvieron menores concentraciones de endoxifeno, pero no de Tamoxifeno, N-desmetiltamoxifeno o 4-hidroxitamoxifeno. La comprensión de la importancia clínica de estos descubrimientos necesita más investigación.

El papel de los genes CYP3A4 y CYP3A5 en el metabolismo del TAM no está del todo claro. A pesar de que se han encontrado genotipos de ambos genes relacionados con alteraciones en la función de las proteínas, hasta el momento no se ha visto una asociación clara entre dichos genotipos y alteraciones en la conversión de TAM en N-desmetil-TAM y de 4-hidroxi-TAM en endoxifeno. (*Tucker et al., 2005. Marsh y McLeod., 2007*). Por otro lado, los genes SULT1A1 y UGT2B15 se han asociado con procesos de transformación química relacionados con la excreción de los metabolitos de TAM y su conversión a moléculas inactivas. (*Nishiyama et al., 2002*). En concreto, estudios *in vivo* han demostrado una asociación entre el alelo SULT1A1\*2 y un aumento en el riesgo de recurrencia en pacientes en tratamiento con TAM. (*Wegman et al., 2005*), aunque no se ha podido comprobar la relación entre este genotipo y las concentraciones plasmáticas de los metabolitos (*Jin et al., 2005*). Por tanto, el estudio de los genes CYP3A4 y CYP3A5 encargados de la transformación de TAM en sus metabolitos secundarios así como profundizar en los genes encargados de su excreción (SULT1A1 y UGT2B15) son un campo de investigación de gran futuro que permitirá ampliar profundamente el conocimiento del tratamiento del cáncer de mama con Tamoxifeno.

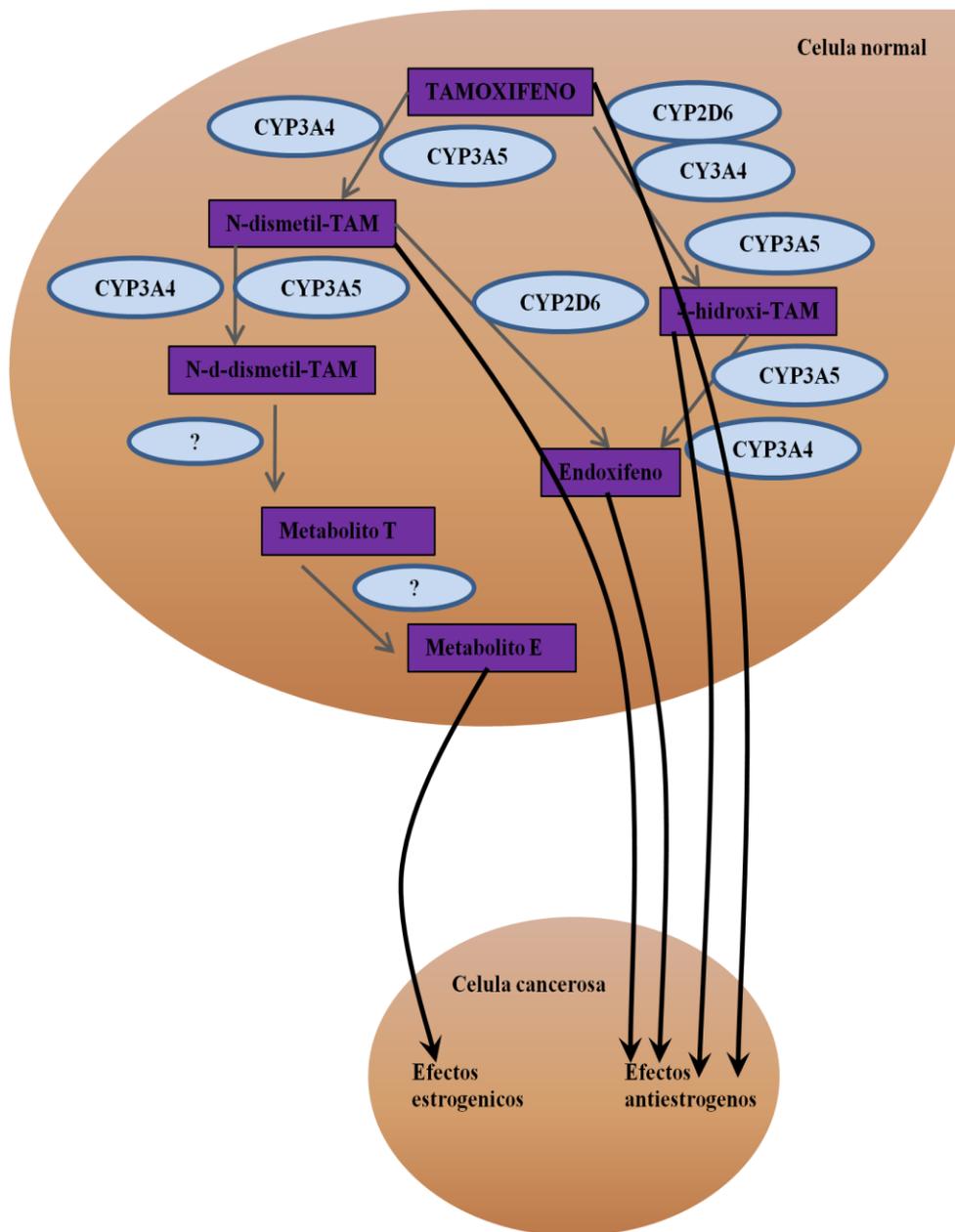


Figura 9. Metabolismo del Tamoxifeno.

### **I.5.2. Dianas de los metabolitos del Tamoxifeno.**

El receptor de estrógenos, diana del Tamoxifeno, está codificado por los genes ESR1 y ESR2 localizados en los cromosomas 6 y 14 respectivamente. La expresión Er d5, variante resultante de la pérdida del exón 5 en el proceso postranscripcional, se ha visto significativamente aumentada en tumores mamarios con respecto a tejido normal. (*Gallachi et al., 1998*). Por tanto se podría sospechar que la presencia de la variante Erd5, no reconocible por TAM, dificultaría la eficacia del tratamiento.

La ciclina D1 (CCND1) parece estar implicada en la activación de la expresión de los receptores de estrógenos ya que su amplificación se ha visto significativamente asociada a una mayor probabilidad de recurrencia. (*Jirstron et al., 2005*), lo que también podría usarse como marcador idóneo para justificar y predecir la terapia con Tamoxifeno.

El gen CYP17A1 se encuentra asociado con los niveles de estrógenos circulantes y, por tanto, parece tener consecuencias en la terapia con TAM. Algunas variantes alelicas se han visto relacionadas con un incremento en los valores plasmáticos de estradiol y, por tanto, con un mayor riesgo de padecer una esteatosis hepática inducida por TAM. (*Ohnishi et al., 2005*).

### **I.5.3. Metabolismo de Tamoxifeno.**

El Tamoxifeno, como hemos venido afirmando, es primariamente convertido en dos metabolitos distintos: N-desmetil-TAM y 4-hidroxi-TAM. Cualquiera de los dos tiene capacidad para convertirse en 4-hidroxi-N-desmetil-TAM o endoxifeno. (Figuras 8 y 9). Desde que fue descrito por primera vez en 1977, el 4-hidroxi-TAM ha sido considerado el principal metabolito activo del TAM debido a su alta afinidad por los receptores estrogénicos y por su potencial entre 30 y 100 veces mayor que el propio TAM para suprimir *in vitro* la proliferación celular en tumores de mama. (*Jordan et al., 1977. Clarke et al., 2003*). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado importantes hallazgos acerca de otro metabolito del TAM, el 4-hidroxi-N-desmetil-TAM, también llamado **endoxifeno**. Aunque ya fue descrito en 1980, su relevancia farmacológica ha sido puesta de manifiesto en los últimos años.

En este sentido, *Borges y colaboradores* (2006) han afirmado que la formación de endoxifeno tiene lugar por oxidación de TAM formándose como intermediario

mayoritario N-desmetil-TAM (NDT) y que el endoxifeno tiene un potencial antiestrogenico *in vitro* 4 veces superior al 4-hidroxi-TAM alcanzando concentraciones plasmáticas 6 veces mayores que 4-hidroxi-TAM en pacientes que están siendo tratadas con Tamoxifeno. Además, otras investigaciones han demostrado en pacientes con dicho tratamiento que los metabolitos más abundantes en el plasma son N-desmetil-TAM y endoxifeno presentando este último una afinidad por el receptor de estrógenos 100 veces mayor que NDT o el propio TAM. (Clarke *et al.*, 2003).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que las concentraciones plasmáticas medias de TAM no muestran diferencias significativas al ser medidas tras 1 y 4 meses del inicio del tratamiento. Sin embargo, si existen diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas medias de los otros tres metabolitos medidas también en los tiempos antes indicados. (Lien *et al.*, 2005). Posibles diferencias en la vida media de estas moléculas, en su tasa de formación y en el aclaramiento de sus metabolitos ayudaran a resolver, con más detalle, la farmacocinética del Tamoxifeno.

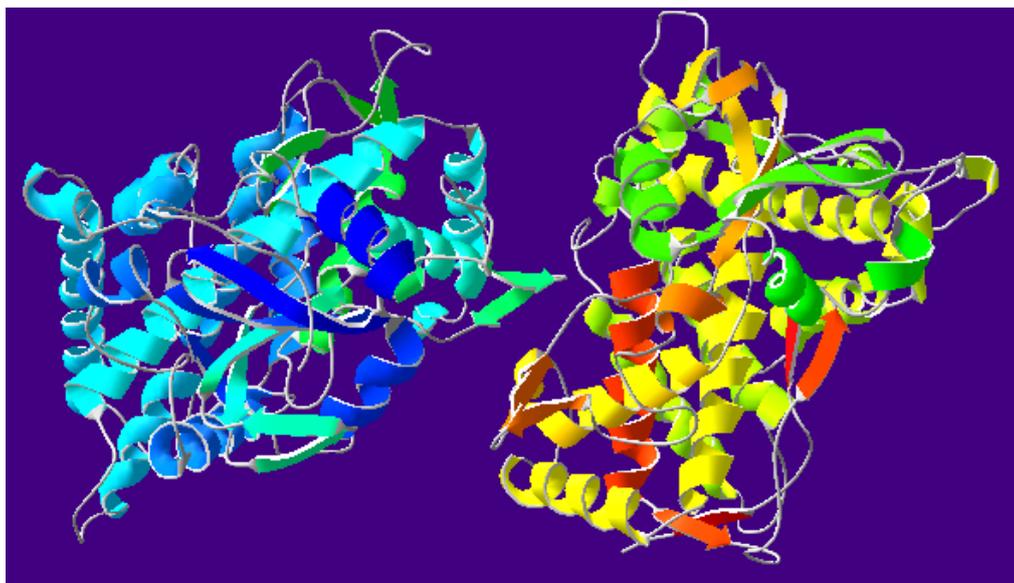
### **I.5.3.1. Superfamilia del citocromo P450.**

La familia de genes del citocromo P450 se encuentra en casi todos los seres vivos de la tierra. Se estima que estos genes, que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo, existen desde hace más de 3.500 millones de años. Los P-450 constituyen una superfamilia de hemoproteínas que pueden encontrarse en numerosas especies (bacterias, hongos, plantas, insectos, nematodos, peces, aves, mamíferos) y para los que se supone un origen común. Todos los P-450 identificados a lo largo de la escala filogenética (desde bacterias hasta mamíferos) se nombran según el mismo criterio y se incluyen dentro de la misma clasificación. Algunos P-450 son comunes a varias especies (p. e. CYP1A2 y CYP2E1 presentes en diferentes mamíferos y roedores) y otros son característicos de una especie en particular (p. e. CYP2A6 o CYP3A4, exclusivos del hombre).

El nombre *citocromo P450* proviene de *cito* (célula) y *cromo* (color), es decir, proteínas coloreadas con un pigmento que absorbe luz a una longitud de onda de 450 nanómetros, justo donde el hierro del grupo hemo es reducido y forma complejos con el monóxido de carbono.

En el ser humano, las enzimas codificadas por los genes CYP450 se encuentran principalmente en el hígado, donde metabolizan fármacos, toxinas y otras sustancias extrañas que entran en el organismo.

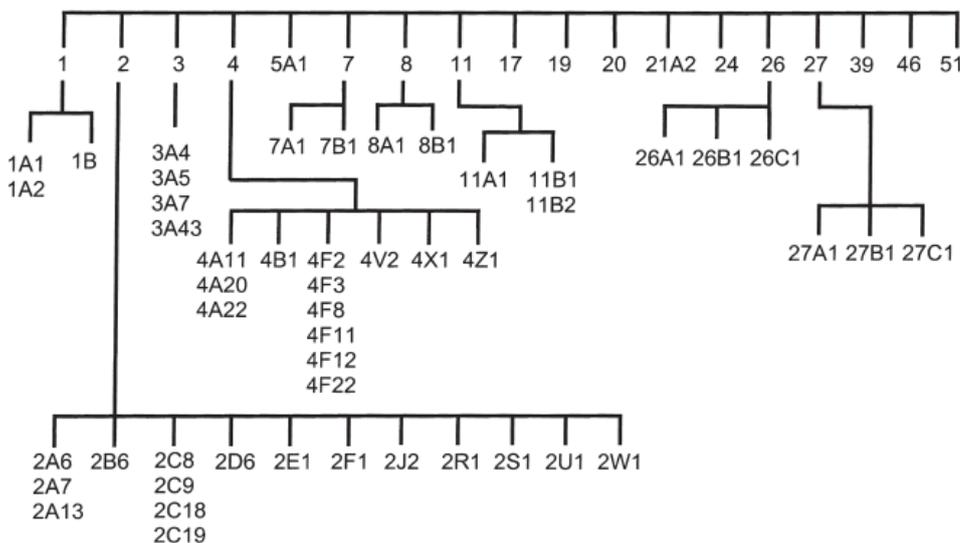
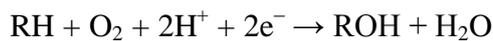
Mediante un proceso denominado “metabolismo oxidativo”, las enzimas P450 incrementan la solubilidad en agua de compuestos extraños para ayudar a su excreción.



**Figura 10.** Estructura del citocromo P-450.

Cuando en 1987 se realizó la primera clasificación de los miembros de esta superfamilia de enzimas, se habían descrito apenas 30 genes diferentes que se agruparon en 10 familias. (Nebert *et al.*, 1987). En poco más de 20 años el número de P-450 conocidos ha aumentado de forma extraordinaria y en la actualidad ya asciende a más de 2000, incluidos en 200 familias diferentes. En el caso concreto del hombre se han secuenciado 57 genes y 47 pseudogenes pertenecientes a 18 familias (Figura 11).

Las proteínas del CYP 450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general forman parte de cadenas de transferencia de electrones. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción monooxigenasa consistente en la inserción de un átomo de oxígeno molecular ( $O_2$ ) en un sustrato orgánico (RH) a la vez que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua:



**Figura 11.** Familia de enzimas del citocromo P450.

En el caso de los fármacos, este proceso afecta a los niveles sanguíneos del compuesto terapéutico aumentando el aclaramiento y, en algunos casos, es un paso necesario para convertir un profármaco inactivo en su metabolito activo. Entre los múltiples miembros de la superfamilia del citocromo P450, se considera que varias enzimas de las familias CYP2 y CYP3 tienen una particular importancia en el metabolismo de los fármacos.

La actividad de la enzima CYP3A4 resulta más afectada por factores ambientales tales como la alimentación y la medicación concomitante que por variaciones heredadas. Por el contrario, la actividad de la **enzima CYP2D6** puede verse ampliamente afectada por variaciones genéticas heredadas además de por los efectos de la medicación concomitante, que pueden inhibir la actividad enzimática y aumentar o disminuir la eficacia del fármaco o las reacciones adversas. La enzima codificada por el gen CYP2D6 juega un papel fundamental en el metabolismo de fármacos utilizados para tratar la depresión grave, la esquizofrenia, el trastorno bipolar, las enfermedades cardiovasculares tratadas con betabloqueantes, el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA) y el cáncer de mama hormonodependiente, entre otros.

Los pacientes tratados con fármacos que son lentamente metabolizados por las enzimas CYP2D6 y CYP2C19 presentan un mayor riesgo de sufrir toxicidad con la dosis

estándar, mientras que los metabolizadores ultrarrápidos pueden no alcanzar los niveles terapéuticos de ese mismo fármaco en sangre con la dosis estándar.

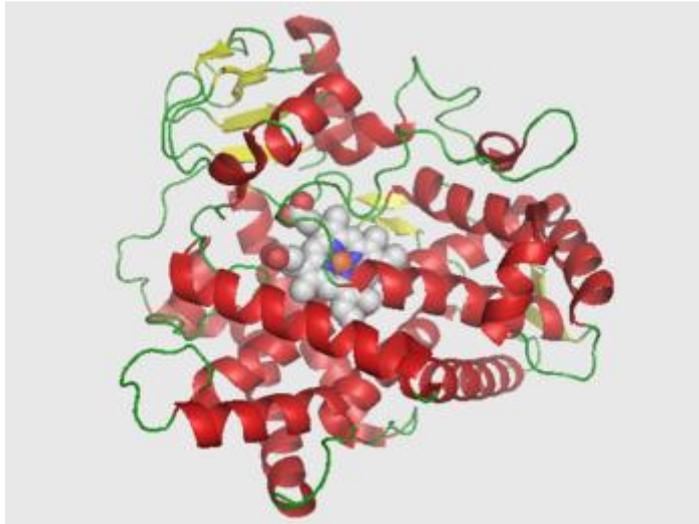
Opuestamente, en el caso de los profármacos (fármacos que requieren una activación metabólica enzimática antes de convertirse en el compuesto terapéutico activo en el organismo), se produce el efecto contrario y los metabolizadores lentos no obtendrán beneficio alguno con estos fármacos.

Aproximadamente el 7% de los individuos de raza blanca son metabolizadores lentos de CYP2D6, mientras que sólo alrededor del 1–2% de los asiáticos y el 2–4% de los norteamericanos de raza negra se encuentran dentro de esta categoría.

### **I.5.3.2. Importancia del gen CYP2D6 en el metabolismo del Tamoxifeno.**

Uno de los genes más extensamente estudiados en cuanto a su relación con el metabolismo del Tamoxifeno es CYP2D6. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 22 y codifica para la enzima P450, familia 2, subfamilia D, polipéptido 6. (Figura 12). Su función principal en el organismo es la hidroxilación de aproximadamente un 25% de los fármacos generando compuestos más solubles en agua y más fáciles de excretar. En el caso del Tamoxifeno participa en la conversión de TAM en 4-hidroxi-TAM y de N-desmetil-TAM en 4-hidroxi-N-desmetil-TAM o endoxifeno. (Figura 3). (*Desta et al., 2004*).

Al contrario de lo que sucede con otros citocromos como CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 o CYP3A4 CYP2D6 no está relacionado con el metabolismo de la precarcinogenesis y los polimorfismos asociados a este gen no muestran diferencias interindividuales en la probabilidad de desarrollar un cáncer. (*Rodriguez-Antona., 2006; Ingelman-Sundberg., 2006*).



**Figura 12.** Estructura tridimensional del CYP2D6.

Sin embargo se han identificado numerosos alelos, en gran parte debido a mutaciones del tipo SNP (*Single Nucleotide polymorphism*) que son responsables de los polimorfismos existentes para el gen CYP2D6. En este sentido el gen CYP2D6, codificante para la debrisoquina hidroxilasa, cuenta con al menos 70 variantes alélicas (*Daly AK., 2003*) que dan lugar a cuatro tipos fenotípicos: metabolizadores deficientes con inactivación génica de ambos alelos, metabolizadores intermedios con un alelo de actividad reducida y un alelo nulo, metabolizadores eficientes con al menos un alelo funcional y metabolizadores ultrarrápidos con una actividad enzimática excesiva debido a la presencia de múltiples (3-13) copias de alelos funcionales como consecuencia de la duplicación génica. (Tabla 2). (*Michalets., 1998; Johansson et al., 1993; Sachse et al., 1997*). En la actualidad han sido identificados más de 100 polimorfismos en el CYP2D6 (*Fernández-Santander et al., 2010.*), (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Aproximadamente un 7% de las mujeres de raza blanca son portadoras de polimorfismos genéticos que conducen a un fenotipo "metabolizador lento o pobre".

**Tabla 2.** Tipos de metabolizadores para el CYP2D6.

Fenotipos	Genotipos	Actividad enzimática
Metabolizador lento	CYP2D6*3	NULA
	<b>CYP2D6*4</b>	
	CYP2D6*5	
	CYP2D6*6	
Metabolizador intermedio	CYP2D6*9	REDUCIDA
	CYP2D6*10	
	CYP2D6*17	
	CYP2D6*29	
Metabolizador rápido	CYP2D6*41	NORMAL
	<b>CYP2D6*1</b>	
	<b>CYP2D6*2</b>	
Metabolizador ultrarrápido	CYP2D6*35	ULTRARRAPIDA
	CYP2D6*1xn	
	CYP2D6*2xn	

En negrita se destacan los genotipos más frecuentes.

Actualmente existen test farmacogenéticos basados en tecnologías de microarrays que analizan de forma precisa y fiable todas las variaciones alelicas asociadas al CYP2D6. Por ejemplo, el Test Amplichip CYP450 (CE-IVD) de Roche detecta 29 mutaciones de CYP2D6 y otras dos de CYP2C19, mayoritariamente de tipo SNP, así como algunas deleciones y duplicaciones. Se basa en una amplificación de regiones específicas de dichos genes por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) a partir de ADN purificado procedente de sangre total. Posteriormente se lleva a cabo un fragmentado y rotulado de los productos amplificados así como una hibridación y tinción del microarray de Afimetrix. Tras una lectura óptica del microarray, el *software* de análisis de datos asociado genera un informe indicando no solo el genotipo del paciente sino también su fenotipo metabolizador (ultrarrápido, eficiente, intermedio o lento). (*Ver apartado Material y Métodos*).

La aplicación de esta tecnología analítica es de enorme interés para el facultativo en lo que se refiere a pacientes en tratamiento con fármacos metabolizados a través de este gen con objeto de individualizar la elección de la terapia y la dosis.

Existen otros métodos analíticos para detectar mutaciones en el gen CYP2D6 basados en la tecnología *Single Base Extension* (SBE). La identificación de mutaciones genéticas mediante la técnica SBE está basada en la utilización de oligonucleótidos específicos, que añadidos a un producto de PCR previamente amplificado, permiten identificar el tipo de nucleótido que ocupa una determinada posición. La particularidad de esta técnica consiste en la naturaleza y composición del oligonucleótido SBE, cuya última base en el extremo 3' terminal es la complementaria a la anterior que es susceptible de ser mutada. Los dideoxinucleótidos que se utilizan en la reacción están marcados con fluoroforos diferentes que impiden la adición de más nucleótidos, de tal forma que la polimerasa añadirá únicamente el nucleótido correspondiente a la posición objeto de estudio y el SNP podrá ser identificado, tras su análisis en el secuenciador, mediante un pico coloreado. Esta técnica, si bien es más económica, permite la detección de un pequeño número de mutaciones en cada reacción aumentando sustancialmente el trabajo experimental en el laboratorio.

CYP2D6\*1 es el alelo normal que codifica para la enzima funcionalmente activa. Los alelos CYP2D6\*2, CYP2D6\*33 y CYP2D6\*35 contienen mutaciones puntuales que no afectan a las propiedades catalíticas del producto génico. La actividad incrementada es consecuencia de una duplicación/amplificación del número de copias del gen activo, habiéndose encontrado hasta 13 copias funcionales del mismo en un alelo. (*Aklillu et al., 1996*). La distribución de alelos de CYP2D6 funcionales, de funcionalidad reducida y afuncionales presenta diferencias raciales y/o étnicas. (*Bjornsson et al., 2003; Solus et al., 2004; Sistonen et al., 2007*). Los alelos de CYP2D6 funcionales son los predominantes en europeos caucásicos, mientras que entre las poblaciones asiáticas o africanas y sus descendientes se da una alta frecuencia de alelos con funcionalidad reducida. Los alelos afuncionales están presentes en mayor medida entre los europeos caucásicos, presentando la menor frecuencia de aparición entre la población asiática. La frecuencia del fenotipo metabolizador ultrarrápido es máxima entre las poblaciones de Arabia Saudí y Etiopía. (*Ingelman-Sundberg., 1999*).

Hace algunos años diversos autores observaron que la pérdida o disminución de la función de CYP2D6 por polimorfismos genéticos (alelos de CYP2D6\*3, 4\*, 5\*, 6\*, 9\*,

10\*, 17\* y 41\*) o por fármacos que inhiben la actividad de esta enzima (como paroxetina y fluoxetina) conducían a una menor concentración plasmática de endoxifeno. (Stearns *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005) y se asociaba a una peor evolución clínica en pacientes con cáncer de mama tratadas con Tamoxifeno. (Kiyotani *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2008; Schroth *et al.*, 2009; Lammers *et al.*, 2010). Sin embargo también se han publicado resultados negativos e incluso opuestos (Nowell *et al.*, 2005; Wegman *et al.*, 2007). Por tanto se necesitan todavía más datos y especialmente estudios prospectivos para resolver esta controversia.

Las variantes alelicas relacionadas con una actividad enzimática nula suelen deberse tanto a SNPs como a la presencia de deleciones, codones stop o defectos de splicing, siendo algunas de las más frecuentes CYP2D6\*4 (15-21% en personas de origen caucasiano) o CYP2D6\*5 (3-6% en diferentes poblaciones). Aproximadamente un 7% a 10% de las mujeres de raza blanca carecen de una actividad enzimática de CYP2D6. Las bases genéticas de este fenotipo “metabolizador lento” están bien caracterizadas: CYP2D6 \*1 es el alelo normal, que codifica una enzima completamente activa. Los polimorfismos CYP2D6 \*4 (1846G>A) y CYP2D6 \*6 (1707T>del) se encuentran en la mayoría (más del 75%) de las pacientes con el fenotipo CYP2D6 “metabolizador lento”. (Bradford LD., 2002; Sachse *et al.*, 1997). Alelos relacionados con una actividad metabólica reducida son, por ejemplo, CYP2D6\*10 (38-70% en asiáticos, 0.05% en caucasianos) o CYP2D6\*17 (20-34% en africanos). En población blanca los alelos CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, CYP2D6\*5 y CYP2D6\*6 son los responsables del 97% de variantes enzimáticas no funcionantes para este gen. (Gaedigk *et al.*, 1997). En el momento actual se han descrito hasta 92 alelos diferentes quedando demostrada la enorme variabilidad interindividual existente para el gen CYP2D6. (Fernández-Santander *et al.*, 2007).

### **I.5.3.3. Genotipos del CYP2D6 versus concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus metabolitos.**

Las concentraciones en plasmas óptimas y estables de los metabolitos de TAM se alcanzan después de cuatro meses de tratamiento con este fármaco. (Borges *et al.*, 2006). Cuando se miden las concentraciones en plasma de TAM, NDT y 4-OH-TAM a los 4

meses del inicio del tratamiento, no se observan diferencias significativas entre pacientes que están medicados con fármacos inhibidores del CYP2D6 y pacientes que no lo están. Sin embargo, las diferencias si son significativas entre ambos grupos de pacientes cuando se miden los niveles plasmáticos de endoxifeno. (*Borges et al., 2006*). Este hecho refleja la importancia de las enzimas de CYP2D6 en la formación de endoxifeno a partir de NDT.

Se ha comprobado la asociación entre los genotipos de CYP2D6 y las concentraciones plasmáticas tanto de endoxifeno como del ratio endoxifeno/ NDT. Se ha visto que las pacientes que mostraban ratios bajos coincidían con aquellas que carecen de algún alelo funcional; ratios intermedios están asociados con pacientes portadoras de una sola copia funcional de CYP2D6; y los ratios mayores se corresponden con mujeres que expresan dos o más copias de alelos funcionales. En concreto, para el alelo 4 (CYP2D6\*4), que es el más común entre europeos como responsable de un metabolismo lento, *Jin y colaboradores (2005)* han demostrado que las pacientes homocigóticas para dicho alelo presentaban niveles plasmáticos de endoxifeno significativamente menores que aquellas con fenotipo normal, observándose valores de concentración intermedios en aquellas pacientes portadoras de una sola copia del gen, es decir, heterocigotas para CYP2D6\*4. Del mismo modo, pacientes homocigotas para este alelo experimentaron un tiempo de recaída significativamente menor y una supervivencia más reducida con respecto a pacientes con al menos una copia del alelo funcional. (*Goetz et al., 2005*). Sin embargo, la tasa de supervivencia se veía significativamente aumentada en aquellos casos en que las portadoras de CYP2D6\*4 además también poseían el genotipo normal para SULT1A1, implicado en la excreción de Tamoxifeno. (*Wegman et al., 2005*). Todos los estudios proporcionan una más que sólida evidencia sobre la enorme utilidad del genotipado para el gen CYP2D6 en mujeres con cáncer de mama candidatas a recibir un tratamiento con Tamoxifeno. En este sentido sería interesante comprobar si el aumento de dosis de TAM en pacientes con cáncer de mama precoz y fenotipo "metabolizador lento" incrementaría la concentración de sus metabolitos activos (especialmente de endoxifeno) a niveles similares a los alcanzados en las metabolizadoras extensivas (normales) y por tanto conseguir un potencial aumento de su eficacia. Estas correcciones de dosis se utilizan en ocasiones en pacientes psiquiátricos metabolizadores deficientes de CYP2D6 que reciben fármacos antipsicóticos y antidepresivos para evitar una toxicidad excesiva o una ausencia de respuesta terapéutica. (*De León et al., 2006*).

#### **I.5.3.4. Inhibidores de CYP2D6.**

Las concentraciones plasmáticas de Endoxifeno en pacientes tratadas con Tamoxifeno no solo están relacionadas con el genotipo de la paciente para CYP2D6 sino también con la toma de otros fármacos de conocida actividad inhibidora del citocromo CYP2D6. Existe un descenso significativo de los niveles plasmáticos de endoxifeno en pacientes que están tomando inhibidores de CYP2D6. Este descenso es muy acusado si los inhibidores son muy potentes como es el caso de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) paroxetina y fluoxetina y, por el contrario, este descenso es menor si se trata de inhibidores más débiles como citalopram o celecoxib.

El tratamiento de Tamoxifeno combinado con inhibidores potentes de CYP2D6 provoca que pacientes metabolizadoras ultrarrápidas para CYP2D6 se conviertan en metabolizadoras muy lentas obteniendo un beneficio mucho menor en lo referente al tratamiento hormonal con TAM como antiestrogénico. (*Borges et al., 2006; Jin et al., 2005*). El genotipado de CYP2D6 también es interesante en pacientes en tratamiento con antieméticos para paliar los efectos secundarios de la quimioterapia como, por ejemplo, ondisetron o tropisetrom. (*Kaiser et al., 2002*). Sin embargo, el uso de fármacos como citalopram o sertralina, utilizados para paliar algunos síntomas de la menopausia, no aparece asociado a una reducción de los niveles plasmáticos de endoxifeno. (*Barton et al., 2003*). Diferentes variantes alelicas asociadas a otros citocromos como CYP2C9 o CYP3A5 no han mostrado una asociación estadísticamente significativa con niveles plasmáticos de Tamoxifeno o de sus metabolitos. (*Jin et al., 2005*).

De lo expuesto anteriormente se deriva la enorme importancia del conocimiento del genotipo para en gen CYP2D6 en pacientes con cáncer de mama que están siendo tratadas con Tamoxifeno. Por un lado, por el hecho de que la presencia de alelos defectivos provoca descensos en las concentraciones de endoxifeno, y teniendo en cuenta que algunos de estos alelos pueden llegar a tener frecuencias de hasta un 21% en la población europea, existiría un colectivo importante de mujeres que estaría obteniendo un beneficio mucho menor de una terapia con Tamoxifeno que pacientes portadoras de copias funcionales. Por otro lado, la relación observada entre el descenso de los niveles plasmáticos de endoxifeno cuando otros fármacos inhibidores del gen CYP2D6 están siendo administrados conjuntamente con TAM, pone de manifiesto el estudio exhaustivo que debe realizarse contemplando todos los fármacos que puedan interferir en la vía metabólica de CYP2D6 y que puedan restar beneficio a la paciente en su tratamiento.

### **I.5.3.5. Papel del CYP2C19 en el metabolismo del Tamoxifeno.**

El citocromo P450 2C19 (abreviado CYP2C19) es miembro del sistema oxidasa de función mixta del citocromo P450. Participa en el metabolismo de xenobioticos en el cuerpo así como en el metabolismo de varios grupos importantes de fármacos entre los que se encuentran los inhibidores de la bomba de protones, los antiepilépticos, propranolol, diazepam y el Tamoxifeno. El gen CYP2C19 codifica la enzima S-mefenitoina hidroxilasa que presenta dos variantes alelicas principales cuya presencia da lugar a una deficiencia enzimática. (*Goldstein JA., 2001*)

Se ha encontrado polimorfismo genético en la expresión de CYP2C19 en aproximadamente un 3-5% de la población de raza blanca y entre un 15-20% en asiáticos, siendo estos individuos metabolizadores pobres sin función CYP2C19 siendo las dos variantes alelicas más comunes de CYP2C19 (2\* y 3\*) las que dan lugar a estas enzimas afuncionales. (*Goldstein JA., 2001*)

El CYP2C19 junto con el CYP 2C9 representan aproximadamente un 20% de la actividad del citocromo P450 en el hígado. Es inhibido por algunos fármacos como la fluvoxamina o la rifampicina.

### **I.5.4. Efectos secundarios del Tamoxifeno.**

El Tamoxifeno puede presentar efectos secundarios a algunas mujeres que lo toman que lo toman como ya se ha descrito en algunos estudios. (*Carpenter y Miller., 2005; Cuzick., 2005*). Los más frecuentes son náuseas, vómitos, dolores de cabeza, sofocos, fatiga, sangrados vaginales, alteraciones en el metabolismo de los lípidos y pérdida de densidad ósea. Además, un efecto secundario muy importante del tratamiento con TAM es el desarrollo de cáncer de endometrio en algunas de las pacientes. Por otro lado, se ha descrito un aumento significativo de trombosis venosas profundas y embolismos pulmonares en pacientes en tratamiento con TAM frente a grupos control tratados con placebo (*Cuzick et al., 2007*) aunque estas diferencias desaparecieron tras la finalización del tratamiento con Tamoxifeno.

Algunos estudios ponen de manifiesto que los efectos secundarios desaparecen tras cinco años de tratamiento mientras que la eficacia del tratamiento parece persistir durante al menos quince años. (*Powles et al., 2007*).

## I.6. MICROARRAYS EN EL CÁNCER DE MAMA.

El origen del cáncer reside en la capacidad que adquieren ciertas células para escapar de los mecanismos que regulan el crecimiento celular normal, llegando así a proliferar de una forma descontrolada. Este escape se produce por la acumulación de alteraciones en los genes implicados en los mecanismos de control celular, por lo que, desde este punto de vista, se puede afirmar que el cáncer tiene un origen genético. (Osorio A., 2006).

En los últimos años se han descubierto multitud de genes implicados en procesos tumorales, como los oncogenes (implicados en la proliferación y diferenciación celular), genes supresores de tumores, genes implicados en la reparación del ADN, apoptosis, metástasis, etc., para los que se ha demostrado su participación en distintos procesos tumorales. (Pedraza et al., 2010).

En la actualidad la investigación en cáncer se enfoca a la identificación de los mecanismos genéticos que originan el tumor y en base a estos mecanismos lograr una clasificación de estos tumores con mayor precisión. Todo ello con el objetivo de elegir terapias específicas y adecuadas a cada caso.

Este reto va a ser posible gracias a la reciente secuenciación del genoma humano, unida al desarrollo tecnológico experimentado en los últimos años con los *microarrays* o micro-matrices, que permiten el análisis de miles de genes a la vez, en un solo experimento. Los *microarrays* o micro matrices, se podrían definir como ensayos en miniatura que permiten el análisis de miles de marcadores genéticos simultáneamente. Aunque esta tecnología fue introducida en los años 90 ha sido en los últimos años cuando ha alcanzado su apogeo.

El cáncer de mama, es la neoplasia más frecuente entre las mujeres del mundo occidental. La alta prevalencia de este tumor, hace que se convierta en uno de los más estudiados y sobre los que más trabajos de investigación se publican, tratando de conocer en detalle los genes implicados en su desarrollo. La posibilidad de analizar los niveles de expresión de miles de genes mediante el uso de los *microarrays*, ha permitido, en éste y otros tipos de cáncer, dos avances fundamentales: 1. La sub-clasificación de tumores con histología similar en base a su perfil de expresión y 2. La identificación de perfiles de expresión asociados con el pronóstico de los tumores.

La Farmacogenómica, es otro de los campos a los que se puede aplicar la tecnología de *microarrays*, en este caso el objetivo sería correlacionar un perfil de expresión tumoral con la respuesta a un tratamiento determinado. En el caso del cáncer de mama, ya se han llevado a cabo algunos estudios que han mostrado asociaciones entre un perfil de expresión tumoral y la sensibilidad a taxotere y a una combinación que contenía antraciclinas, respectivamente. (Ayers *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2003).

La tecnología de los *microarrays* nos está permitiendo profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los tumores, paso necesario para mejorar e individualizar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Los *microarrays* de expresión, empiezan a mostrar resultados prometedores que se podrán aplicar en la clínica en un futuro no muy lejano. El diseño de los ensayos clínicos apropiados, en combinación con análisis genómicos a gran escala, optimizados y validados, nos permitirán entender los mecanismos que controlan el comportamiento de los tumores y eventualmente mejorar el tratamiento de los pacientes. (Osorio A., 2006).

## **II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**

---



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Las variantes genéticas de CYP2D6 constituyen un determinante importante para el efecto del Tamoxifeno y la menor o nula actividad de CYP2D6 puede significar un mayor riesgo de fracaso primario en el tratamiento con Tamoxifeno para casi un 10% de las pacientes. Por lo tanto, la determinación del genotipo de CYP2D6 podría implicar una optimización en la selección de un tratamiento hormonal individualizado para las pacientes con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo. En esta línea el comité consultivo de la FDA estadounidense recomendó en octubre/2006 que la información del prospecto de TAM incluyera una mención de la posibilidad de que el medicamento podía ser inefectivo en aquellas mujeres postmenopáusicas portadoras de un genotipo de CYP2D6 “metabolizador lento”. (*Clinical Pharmacology Subcommittee-Advisory Committee meeting*). Con respecto a las mujeres metabolizadoras lentas de CYP2D6, se debería utilizar una estrategia hormonal alternativa al TAM. Para las pacientes postmenopáusicas, los Inhibidores de la Aromatasa han demostrado una eficacia superior a TAM como terapia adyuvante o como tratamiento para la enfermedad avanzada. Sin embargo, para las mujeres premenopáusicas, o ante el fracaso o contraindicación a los IA para las postmenopáusicas, sería interesante investigar posibles estrategias dirigidas a conseguir concentraciones eficaces de los metabolitos activos del TAM. En este sentido nos proponemos estudiar si el aumento de dosis de TAM en estas mujeres conseguiría aumentar la concentración de sus metabolitos activos (especialmente de endoxifeno) a niveles similares a los alcanzados en las metabolizadoras eficientes (o normales), y por tanto se lograría un potencial aumento de su eficacia. Estas correcciones de dosis se utilizan en ocasiones en los metabolizadores deficientes de CYP2D6 en otras situaciones clínicas (por ejemplo, fármacos antipsicóticos y antidepresivos) para evitar una toxicidad excesiva o una ausencia de respuesta terapéutica. (*De León et al., 2006*).

Por ello, nos proponemos la realización de un estudio que determine los niveles plasmáticos de endoxifeno en pacientes metabolizadoras lentas de CYP2D6 tras la administración de dosis de Tamoxifeno superiores a 20 mg/día.

**Por tanto nos planteamos el siguiente objetivo general:**

Comparar las concentraciones plasmáticas de endoxifeno de las pacientes del estudio “metabolizadoras lentas” para CYP2D6 en los tres niveles de dosis de Tamoxifeno (20, 40 y 60 mg/día), con las de las pacientes del grupo control “metabolizadoras eficientes” de CYP2D6 en tratamiento con dosis convencionales de Tamoxifeno.

**Con este fin, el trabajo de investigación presente se ha desarrollado en base a los siguientes objetivos específicos:**

1. Determinar el genotipo para CYP2D6 y CYP2C19 (metabolizador ultrarrápido, eficiente, intermedio o lento) en las pacientes objeto de estudio.
2. Confirmar que las pacientes metabolizadoras lentas de CYP2D6 en tratamiento con dosis convencionales de Tamoxifeno tienen niveles plasmáticos de endoxifeno significativamente inferiores a los de las metabolizadoras eficientes a las mismas dosis.
3. Evaluar las concentraciones del principal metabolito activo de Tamoxifeno (endoxifeno) obtenidas bajo tratamiento con dosis crecientes de Tamoxifeno (20, 40 y 60 mg) en pacientes con cáncer de mama hormonodependiente y portadoras de un genotipo de CYP2D6 "metabolizador lento."

### **III. MATERIAL Y METODOS**

---



### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### III.1. PACIENTES.

##### III.1.1. Criterios de Inclusión y Exclusión.

En el presente estudio hemos analizado 90 muestras de sangre, para realizar el genotipado, pertenecientes a pacientes remitidas por el Servicio de Oncología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada entre los meses de Enero a Noviembre de 2009 en base a los siguientes criterios:

##### **Criterios de Inclusión:**

- Mujeres  $\geq$  18 años.
- Índice del estado funcional de Karnofsky  $\geq$ 80/ECOG 0-1.
- Diagnóstico de cáncer de mama histológicamente demostrado y hormonosensible (con receptores de estrógeno (RE) y/o receptores de progesterona (RPg) positivos), con estadio I, II o III (T1-3, M0), sin evidencia de diseminación a distancia.
- La paciente debe haber recibido un tratamiento quirúrgico definitivo para el cáncer de mama operable, bien mastectomía o bien cirugía conservadora, y debe haber completado el tratamiento quimioterápico adyuvante (o neoadyuvante) si éste estuviera indicado.
- El tratamiento hormonal adyuvante con Tamoxifeno debe estar indicado. En el momento de la inclusión en el estudio la paciente puede estar pendiente de iniciar la terapia hormonal o puede haberla iniciado ya, pero en este último caso debe estar planeado continuar la administración de Tamoxifeno durante al menos 8 meses más.
- Las mujeres en edad fértil deben utilizar un método anticonceptivo fiable y apropiado. Las mujeres postmenopáusicas (no histerectomizadas) deben haber permanecido amenorreicas durante al menos 12 meses para ser consideradas como no fértiles (o al menos 24 meses si la amenorrea ha sido inducida por el tratamiento quimioterápico adyuvante).

### *III. Material y Métodos.*

---

- Prueba de embarazo negativa en orina o suero en las mujeres con potencial de fertilidad, realizada en los 14 días anteriores a la inclusión en el estudio.
- Ausencia de anomalías significativas en los parámetros de laboratorio: hemograma (hemoglobina >10g/dL, neutrófilos > 1,5 x 10<sup>9</sup>/L, plaquetas > 100 x 10<sup>9</sup>/L); parámetros de función hepática (ASAT/SGOT, ALAT/SGPT y fosfatasa alcalina < 2,5 veces el límite superior de normalidad, bilirrubina total < 2,5 mg/dl) y creatinina < 2.0 mg/dl (en los 15 días previos al registro de la paciente).
- Electrocardiograma normal (o con anomalías no significativas) realizado en las 8 semanas previas al registro de la paciente.
- Radiografía de tórax normal (o sin hallazgos patológicos relevantes) realizado durante las 8 semanas previas al registro de la paciente.
- La paciente deberá firmar previamente un Consentimiento Informado para la realización del análisis del genotipo de CYP2D6. Posteriormente, si la paciente es elegible, deberá firmar un Consentimiento Informado por escrito para la realización de los niveles plasmáticos de Tamoxifeno y sus metabolitos.

#### **Criterios de Exclusión:**

- Pacientes con tumores con receptores de estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RP) ambos negativos.
- Mujeres con contraindicación para recibir Tamoxifeno (antecedentes de enfermedad tromboembólica, hiperplasia endometrial o síntomas ginecológicos anormales como metrorragia), así como hipersensibilidad conocida a Tamoxifeno.
- Pacientes embarazadas o en período de lactancia. Pacientes con potencial de fertilidad y un resultado desconocido o positivo en la prueba de embarazo en orina o suero, realizada en los 14 días anteriores a la inclusión en el estudio.
- Tratamiento concomitante con otra terapia hormonal sistémica, o con fármacos citotóxicos.
- Tratamiento médico concomitante para los sofocos o acaloradas postmenopáusicas.
- Tratamiento concomitante con inhibidores potentes de CYP2D6 como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS, especialmente paroxetina y

fluoxetina) u otros inhibidores menos potentes de CYP2D6 (como sertralina y citalopram entre los ISRS, doxepina, celecoxib, difenhidramina, clorfeniramina, amiodarona, cimetidina, haloperidol y ticlopidina).

- Pacientes con tratamiento anticoagulante con derivados de cumarina.
- Pacientes que no deseen/puedan cumplir con el estudio.

### **III.1.2 Sujetos que formaran el Grupo Control.**

Las mujeres que constituirán el “grupo control” serán aquellas primeras 20 pacientes que de forma consecutiva hayan sido rastreadas para el genotipo de CYP2D6 y se haya encontrado un genotipo que se corresponda con un estado metabolizador normal. Se excluirá del “grupo control” a aquellas pacientes que durante el tratamiento con Tamoxifeno a dosis estándar precisen recibir simultáneamente fármacos que inhiban potentemente la actividad de CYP2D6, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS, especialmente paroxetina y fluoxetina) u otros inhibidores menos potentes de CYP2D6 (como sertralina y citalopram (entre los ISRS), doxepina, celecoxib, difenhidramina, clorfeniramina, amiodarona, cimetidina, haloperidol y ticlopidina).

### **III.2. CRONOLOGÍA DEL ESTUDIO.**

Inicio de la Inclusión: Enero de 2009.

Fin de la Inclusión: Noviembre de 2009.

Fin del periodo de tratamiento: Diciembre de 2010.

Análisis y discusión de los datos: Primer cuatrimestre de 2011.

### III.3. TRATAMIENTO.

#### III.3.1. Duración del Tratamiento.

La duración previsible del tratamiento de cada paciente es de 8-12 meses, dependiendo de que ya hubiera iniciado, o no, el tratamiento adyuvante con dosis convencionales de Tamoxifeno (nivel 1: 20 mg/día) antes de su inclusión en el estudio, respectivamente.

#### III.3.2. Descripción del Tratamiento.

A las pacientes elegibles se les administrará Tamoxifeno por vía oral durante el período del estudio. Cada paciente traspasará, de forma secuencial, tres niveles sucesivos de dosis de Tamoxifeno: 1) nivel 1: 20 mg/día; 2) nivel 2: 40 mg/día; y 3) nivel 3: 60 mg/día, permaneciendo durante 4 meses ( $\pm$  1 semana) en cada nivel de dosis (intervalo de tiempo en el que se alcanza el estado de equilibrio o meseta de las concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus metabolitos). El máximo período de tiempo que una paciente puede permanecer en el estudio es de 12 meses. Las pacientes tomarán la medicación preferentemente en una dosis única diaria por la mañana, aunque si fuese necesario por razones de tolerabilidad se podría fraccionar la dosis. Al finalizar cada nivel de dosis, se realizará una extracción de sangre para determinar la concentración plasmática de Tamoxifeno y sus metabolitos, y se saltará al siguiente nivel de dosis.

- o Si la paciente ya hubiera iniciado el Tamoxifeno (a dosis convencionales de 20 mg) antes de su inclusión en el estudio y llevara cuatro o más meses de tratamiento, se realizará la primera determinación de la concentración plasmática de endoxifeno y se saltará automáticamente al segundo nivel de dosis.
- o Si la paciente ya hubiera iniciado el Tamoxifeno (a dosis convencionales de 20 mg) antes de su inclusión en el estudio pero llevara menos de cuatro meses de tratamiento, continuará el mismo hasta completar cuatro meses, se realizará la primera determinación de la concentración plasmática de endoxifeno y se saltará al segundo nivel de dosis.

- o Si la paciente no hubiera iniciado aún la terapia hormonal con Tamoxifeno, comenzará en el primer nivel de dosis una vez incluida en el estudio.

### **III.3.3. Modificación de la pauta de tratamiento.**

En caso de presentarse síntomas leves con el aumento de dosis de Tamoxifeno (cefalea, mareo, epigastralgia) podrá fraccionarse la dosis total diaria de Tamoxifeno (20 mg cada 8 o 12 horas).

En caso de aparición de efectos adversos más graves, como eventos tromboembólicos, cáncer de endometrio, reacciones de hipersensibilidad graves, trastornos visuales, pancreatitis o hepatitis, se suspenderá el Tamoxifeno y se retirará a la paciente del estudio.

## **III.4. DESARROLLO DEL ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES.**

### **III.4.1. Variable principal: Comparación de los niveles plasmáticos de endoxifeno.**

La evaluación del objetivo principal consistirá en la comparación de la concentración plasmática media de endoxifeno en cada nivel de dosis para determinar si el aumento de dosis de Tamoxifeno en esta población produce un aumento significativo de la concentración de endoxifeno hasta niveles similares a los obtenidos con dosis convencionales de Tamoxifeno (20 mg) en las pacientes metabolizadoras eficientes (normales) de CYP2D6.

#### **III.4.2. Variable secundaria: Confirmar niveles de endoxifeno inferiores en las “metabolizadores lentas” de CYP2D6.**

Del conjunto global de pacientes con cáncer de mama RE-positivo tratadas con dosis convencionales de Tamoxifeno (20 mg), se comparará la concentración media de endoxifeno a los 4 meses de tratamiento del grupo metabolizadoras lentas de CYP2D6 con respecto a las metabolizadoras eficientes. De esta manera se pretende confirmar que las pacientes metabolizadoras lentas de CYP2D6 tienen niveles plasmáticos de endoxifeno significativamente inferiores a los de las metabolizadoras eficientes tratadas con las mismas dosis de Tamoxifeno.

### **III.5. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES.**

#### **III.5.1. Estudio del genotipo de CYP2D6.**

##### **III.5.1.1. Extracción del DNA.**

El DNA genómico fue extraído a partir de los leucocitos de 200  $\mu$ L de sangre periférica (sangre entera). La sangre debe recogerse en tubos con EDTA (parte superior color lavanda) como anticoagulante. Para la extracción de DNA se utilizó el extractor automático de DNA “QIAcube” de Izasa según lo especificado por dicha casa comercial y atendiendo al siguiente protocolo:

##### **PROTOCOLO EXTRACCIÓN DNA QIAcube:**

Mientras se homogeniza la sangre, numerar:

Tubos 1.5 mL con el número de cada muestra.

Ponerlos en la columna.

En un tubo 2 mL de rosca: añadir 200  $\mu$ L de sangre por cada muestra.

Añadir la proteasa, en tubo 1.5 mL, de acuerdo al número de muestras:

2 muestras_ 68 µL proteasa	7 muestras_176 µL proteasa
3 muestras_90 µL proteasa	8 muestras_198 µL proteasa
4 muestras_111 µL proteasa	9 muestras_219 µL proteasa
5 muestras_133 µL proteasa	10 muestras_241 µL proteasa
6 muestras_155 µL proteasa	12 muestras_284 µL proteasa

En el caso de procesar una u once muestras se pondrá un blanco con agua para equilibrar y será una muestra más.

Colocar el tubo con la proteasa en la posición A del QIAcube, introducir la tapa del tubo en la ranura correspondiente.

Colocación de los tubos en el rotor adaptador Y del extractor QIAcube. Se comprueban los niveles de buffer y se rellena si es necesario. Hay que cambiar el agua desionizada y autoclavada cada vez que se procesen nuevas muestras.

Se colocan simuladores de silicona al lado de cada tubo de rosca.

Se selecciona el protocolo “dna 200 µL elution” en la pantalla del aparato y se siguen las instrucciones.



**Figura 13.** Extractor de DNA QIAcube.

### **III.5.1.2. Cuantificación del DNA.**

La cuantificación de DNA se realizó midiendo la absorbancia (A) a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway-Genova). Una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a 50 ng/ $\mu$ L de DNA de doble hebra. Para determinar la pureza del DNA se calculó la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia (A) a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ).

Los parámetros de calidad de DNA genómico que debemos considerar para determinar si una muestra es válida para ser amplificada y procesada con Amplichip CYP450 son:

- concentración entre 2 y 20 ng/ $\mu$ l.
- relación  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,50 y 1,85. Si es menor indica contaminación por proteínas.

Si es necesario diluir el DNA, se debe utilizar como diluyente: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, azida sódica al 0.09%, pH 8.0.

El DNA extraído se puede almacenar, diluido o sin diluir, refrigerado entre 2-8°C durante un tiempo máximo de una semana, o congelado a -20°C un máximo de un mes, con no más de 3 ciclos de congelación/descongelación.



**Figura 14.** Espectrofotómetro Jenway-Genova.

### III.5.1.3. Reactivos y consumibles empleados.

#### III.5.1.3.1. Reactivos.

- ✓ AmpliChip CYP 450 Test de Roche Diagnostics.
- ✓ DNasa I de Roche Applied Sciences.
- ✓ Fosfatasa alcalina de Roche Applied Science.
- ✓ Transferasa terminal de Roche Applied Science.
- ✓ Conjugado estreptavidina / R-ficoeritrina de Roche Diagnostics.
- ✓ EDTA 0,5M pH 8,0 de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA.
- ✓ Agua destilada o desionizada.
- ✓ Agua, uso Biología Molecular, exenta de nucleasa de Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.
- ✓ Tampón SSPE 20X AccuGENE Cambrex, Rockland, ME.
- ✓ Triton X-100 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- ✓ Solución de Denhardt, concentrado 50X de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- ✓ Solución de azida sódica, 5% (p/v) de VWR International, Mississauga, Ontario.
- ✓ Albúmina sérica bovina acetilada 20 mg/ml de Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.
- ✓ High DNA Mass Ladder de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA.
- ✓ Solución Hipoclorito Sódico 4% (NaClO) (500mL) de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- ✓ Tris-HCl 10 mM.
- ✓ Etanol  $\geq$  96%.

El kit de AmpliChip CYP 450 Test de Roche Diagnostics para 24 pruebas comprende:

- **CYP450 MMX** (1 x 1,3 mL)

(Master Mix para AmpliChip CYP450)

Sulfato de amonio

Cloruro potásico

Tampón Tris-HCl

< 10% de dimetil sulfóxido

< 0,05% de una mezcla propietaria de ADN polimerasas Gold

< 0,05% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana)

< 0,001% de dATP, dGTP, dCTP, dTTP y dUTP

0,09% de azida sódica

- **CYP450 PM-A** (1 x 0,7 mL)

(Mezcla de iniciadores A para AmpliChip CYP450)

Tampón Tris-HCl

< 0,001% de iniciadores específicos para el gen CYP2D6

0,05% de azida sódica

- **CYP450 PM-B** (1 x 0,7 mL)

(Mezcla de iniciadores B para AmpliChip CYP450)

Tampón Tris-HCl

< 0,001% de iniciadores específicos para los genes CYP2D6 y CYP2C19

0,05% de azida sódica

- **Mg<sup>2+</sup>** (1 x 1,3 mL)

(Solución de cloruro magnésico AmpliChip)

Cloruro magnésico

0,05% de azida sódica

- **TdT** (1 x 25 µL)

(Reactivo de rotulado por TdT AmpliChip)

Reactivo de rotulado por TdT

Tris

EDTA

- **B1 Oligo** (1 x 1,3 mL)

(Solución de oligonucleótidos B1 AmpliChip)

Tampón Tris-HCl

< 0,001% de oligonucleótidos B1

0,05% de azida sódica

- **CYP450 Array** (24 pruebas)

(Microarray para AmpliChip CYP450)

Microarray para AmpliChip CYP450

- **CYP450 (+) C** (1 x 20 µL)

(Control positivo para AmpliChip CYP450)

Tampón Tris-HCl

EDTA

0,002% de ADN genómico humano

0,09% de azida sódica

- **A-CHIP (-) C** (1 x 1,2 mL)

(Control negativo AmpliChip)

Tampón Tris-HCl

EDTA

0,09% de azida sódica

#### III.5.1.3.2. Consumibles.

- ✓ Tubos de reacción 0,2 mL para TC ABI 9700 de Roche Diagnostics.
- ✓ Tapones para TC ABI 9700 de Roche Diagnostics.
- ✓ Juegos de bandeja/retenedor MicroAmp de Applied Biosystems.
- ✓ Base MicroAmp de Applied Biosystems.
- ✓ Etiquetas o Tough-Spots pequeños de USA Scientific, Inc., Ocala, FL.
- ✓ Tubos con tapa de rosca 2,0 mL de Sarstedt.
- ✓ Tubos para microcentrifugación 1,5 mL de VWR.
- ✓ Tubos cónicos de polipropileno estéril 15 mL de Corning.
- ✓ Frascos de medios cuadrados de 500 mL. Nalgene.

#### III.5.1.3.3. Materiales varios.

- ✓ Pipeteadores ajustables (2-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL) con puntas exentas de nucleasas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo.
- ✓ Bloque de calor seco (95° C).
- ✓ Pipetas serológicas desechables estériles de 5 y 10 mL.
- ✓ Vasos de precipitados graduados.
- ✓ Mezclador vorticial.
- ✓ Rejillas de tubos.
- ✓ Guantes desechables no empolvados.

- ✓ Baño de agua helada.
- ✓ Papel de aluminio.

#### **III.5.1.4. Amplificación del DNA.**

##### *Selección del objetivo*

La prueba AmpliChip CYP450 amplifica los genes CYP2D6 y CYP2C19 en dos reacciones separadas que posteriormente se combinan tras la amplificación mediante PCR. La reacción que contiene la mezcla de iniciadores A para CYP450 utiliza iniciadores que generan un producto amplificado que comprende la región reguladora y regiones codificadoras del gen CYP2D6 así como un producto específico de la duplicación del gen CYP2D6 cuando esté presente en la muestra o en el control. La reacción que contiene la mezcla de iniciadores B para CYP450 utiliza iniciadores que generan un producto amplificado que comprende del exón 4 al exón 5 del gen CYP2C19 así como un producto específico de la delección del gen CYP2D6 cuando esté presente en la muestra o en el control.

##### *Amplificación del objetivo*

Se utiliza una mezcla propietaria de ADN polimerasas AmpliTaq® Gold para conseguir tanto la amplificación con “hot start” del ADN objetivo del CYP450 como una actividad correctora para la eficiente amplificación de secuencias objetivo largas.

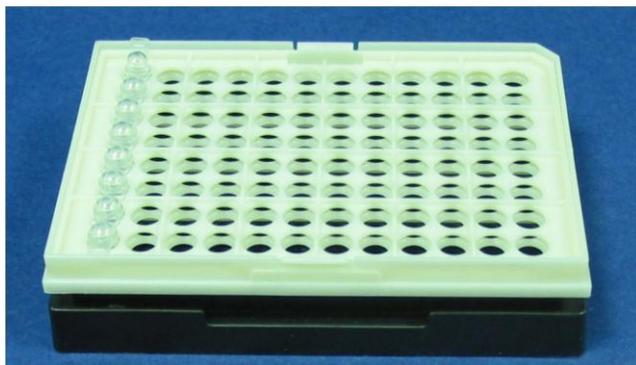
En primer lugar, se calienta la mezcla de reacción PCR para activar las ADN polimerasas AmpliTaq® Gold, desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias objetivo de los iniciadores. A medida que la mezcla se enfría, los iniciadores se templan a las secuencias de ADN objetivo. Las ADN polimerasas AmpliTaq® Gold, en presencia de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) y de un exceso de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), prolongan los iniciadores templados a lo largo de las plantillas del objetivo para generar una molécula de ADN bicatenario denominada amplicón. Este proceso se repite durante 35 ciclos para doblar en cada ciclo la cantidad de ADN amplicón. La amplificación tiene lugar únicamente en la región de los genes CYP2D6 y CYP2C19 situada entre los iniciadores; no se amplifica el genoma completo.

### *Amplificación selectiva*

La amplificación selectiva del ácido nucleico objetivo presente en la muestra se consigue en la prueba AmpliChip CYP450 usando la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y trifosfato de deoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina (Longo *et al.*, 1990), pero no del ADN que contiene deoxitimidina. El ADN natural carece de deoxiuridina, que sin embargo está siempre presente en los amplicones debido al empleo de trifosfato de deoxiuridina como uno de los dNTP del reactivo de mezcla maestra (Master Mix); por lo tanto, sólo el amplicón contiene deoxiuridina. La deoxiuridina hace al amplicón contaminante susceptible de destrucción por la enzima AmpErase previamente a la amplificación del ADN objetivo. Asimismo, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar entre la activación inicial de la mezcla maestra mediante la adición de magnesio y el inicio de la ciclación térmica, mejorando así la especificidad y la sensibilidad de la prueba. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo Master Mix, cataliza la escisión del ADN en las posiciones correspondientes a los residuos de deoxiuridina abriendo la cadena de deoxirribosa en la posición C-1. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN no pueda ya amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55°C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo formado durante la amplificación.

Antes de comenzar la amplificación propiamente dicha es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Atemperar las muestras, Master Mixes y controles durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Homogeneizar las muestras y las Master Mixes mediante inversión de 10 a 15 veces.
- Colocar 96 tubos en la bandeja MicroAmp y bloquearlos con el retenedor. (Figuras 15 y 16)
- Conectar el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 al menos 15 minutos antes de usarlo.
- Para preparar la Master Mix y los controles utilizar tubos de 2.0 mL con tapón de rosca para evitar contaminaciones.



**Figura 15.** Bandeja MicroAmp.



**Figura 16.** Tubos de amplificación y tapas.

#### **III.5.1.4.1. Preparación de las CYP450 Working Master Mixes y el Control Positivo.**

Antes de preparar las Mezclas Madres o *Working Master Mixes*, es necesario llenar todos los tubos de amplificación que no van a ser utilizados con 100  $\mu$ L de agua. Tapar los tubos y marcarlos para distinguir los que contienen agua de los que contendrán muestras. A continuación se seguirán los siguientes pasos:

1. Se calculan los volúmenes de los diferentes reactivos multiplicando las cantidades de la tabla 3 para una sola reacción por el número de reacciones necesarias ( $n^{\circ}$  de muestras + 1 control positivo + 1 control negativo) y luego multiplicar las cantidades por 1,05 para asegurar un volumen suficiente. Se recomienda trabajar en series analíticas de 8 determinaciones.

- Se etiquetan dos tubos de 2,0 mL como A y B. Para preparar la *Working Master Mix A* (Mezcla A) y la *Working Master Mix B* (Mezcla B) se pipetea en el tubo correspondiente los volúmenes adecuados de cada reactivo en función de las muestras y controles a amplificar, en el orden especificado. Tapar los tubos e invertirlos de 10 a 15 veces para homogeneizar su contenido. Hacer un pulso de centrifuga. Las soluciones de ambas mezclas deben utilizarse dentro de la hora siguiente a su preparación.

**Tabla 3.** Reactivos y volúmenes para la amplificación.

<i>Working Master Mixes CYP450 A y B</i>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1 Reacción</b>
AmpliChip CYP450 Test Master Mix (tapón blanco)	25 µL
AmpliChip CYP450 Test Primer Mix A (verde) o Primer Mix B (azul)	25 µL
AmpliChip CYP450 Test Mg <sup>2+</sup> (tapón amarillo)	25 µL
Volumen TOTAL para <i>Working Master Mix A</i> y <i>Working Master Mix B</i>	75 µL

- Marcado de un tubo de 2 mL con tapa de rosca para el control positivo.
- Mezclar en vórtex durante 5 segundos el vial de control positivo, y realizar un pulso de centrifuga.
- Para preparar el control positivo se añaden 54 µL de control negativo (tapón lila) y 6 µL de control positivo (tapón naranja).
- Mezclar en vórtex durante 5 segundos, y realizar un pulso de centrifuga.
- Coger la gradilla con los tubos de amplificación. Se necesitan dos tubos de reacción por cada muestra o control. Se recomienda trabajar siempre por filas o por columnas.
- Hay que pipetear 75 µL de *Working Master Mix A* en un tubo de amplificación para cada muestra o control. No tapar aún los tubos.
- Igualmente se pipetea 75 µL de *Working Master Mix B* en un tubo de amplificación para cada muestra o control. No tapar aún los tubos de reacción.

10. Se añaden 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra, control positivo preparado y control negativo a los tubos de amplificación que contienen la Working Master Mix A, homogeneizando mediante varios pipeteos de aspiración/dispensación. Para ello se utiliza una punta con filtro nueva para cada muestra o control. A continuación se tapan los tubos.

11. Se añaden 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra, control positivo preparado y control negativo a los tubos de amplificación que contienen la Working Master Mix B, homogeneizando mediante varios pipeteos de aspiración/dispensación. Utilizar una punta con filtro nueva para cada muestra o control. Tapar los tubos.

12. La amplificación debe comenzar en un plazo máximo de 15 minutos.

13. A continuación se transfiere la gradilla al área de amplificación/detección y se selecciona el programa de PCR del termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 (Figura 16) para el test de AmpliChip CYP450:

**2 min 50°C + 10 min 95°C + (35 ciclos): 20 seg 95°C, 4 min 67°C + 7 min 72°C + 4°C indefinidamente.**

14. Se coloca la gradilla con los tubos de amplificación en el termociclador y comprueba que todos los tubos estén correctamente tapados.

15. Por último se seleccionará el Método y se presionará *START*. Es necesario comprobar que las opciones *Ramp Speed* y *Reaction Volume* se encuentran programadas como “*MAX*” y “*100  $\mu\text{L}$* ” respectivamente. Pulsar *START* nuevamente.

16. Comprobar la hora de finalización de la amplificación. El proceso durará aproximadamente 3 horas y 20 minutos.



**Figura 16.** Termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700.

17. Para finalizar se procederá a retirar la gradilla con el material amplificado del termociclador y colocarla en la base MicroAmp. En caso necesario, los tubos de reacción pueden permanecer en el termociclador a 4 °C durante un período máximo de 18 horas una vez completada la amplificación.

Si los productos amplificados no pueden ser fragmentados inmediatamente, deberán ser almacenados a -20°C durante un tiempo máximo de 1 semana. En caso de procesarlos al día siguiente, pueden ser mantenidos en nevera a 4°C.

#### **III.5.1.5. Fragmentación del DNA.**

Los segmentos de ADN amplicón obtenidos para cada muestra en las dos reacciones de amplificación independientes se combinan y se escinden mediante incubación con la muestra de fragmentación de trabajo. La fragmentación se lleva a cabo por acción de la DNasa I y genera pequeños fragmentos de ADN con un tamaño medio de 50 a 200 nucleótidos. La fosfatasa alcalina presente en la mezcla de fragmentación de trabajo destruye los dNTP residuales de las reacciones de amplificación. Los segmentos de ADN amplicón fragmentados se rotulan a continuación con biotina en su extremo

terminal 3' mediante la acción de una transferasa terminal usando el reactivo de rotulado TdT AmpliChip como substrato.

En primer lugar se comprueba que el amplicón (si ha sido almacenado a -20°C) se haya descongelado completamente. Es importante mantener tapados los tubos que están llenos de agua mientras se mezclan los amplicones. El proceso es el siguiente:

1) Retirar las tapas de los tubos de amplificación con la *Working Master Mix A* con cuidado para evitar la creación de aerosoles. Mezclar el amplicón con la punta de la pipeta tres veces antes de coger 8 µL de cada tubo y transferirlo al tubo apropiado de la nueva gradilla para la fragmentación. Utilizar una punta con filtro para cada muestra y control.

2) Retirar las tapas de los tubos de amplificación con la *Working Master Mix B* con cuidado para evitar la creación de aerosoles. Mezclar el amplicón con la punta de la pipeta tres veces antes de coger 8 µL de cada tubo y transferirlo al tubo apropiado de la nueva gradilla para la fragmentación que ya contendrá 8 µL del amplicón de la *Working Master Mix A*. Utilizar una punta con filtro para cada muestra y control.

3) Tapar los tubos.

#### **III.5.1.5.1. Preparación de la CYP450 Mezcla de Trabajo para la Fragmentación o *Working Fragmentation Mix*.**

Todo el trabajo debe realizarse en baño de agua helada. Preparamos el baño de agua helada evitando que los líquidos (reactivos y amplificados) se congelen. Es necesario:

- Reunir todos los componentes de la Mezcla para la Fragmentación o *Working Fragmentation Mix*.
- Coger una segunda gradilla con nuevos tubos de amplificación (usar tubos y tapas separados con la bandeja/retenedor).
- Conectar el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 para la incubación de la fragmentación, al menos 15 minutos antes de comenzar esta fragmentación.

Es importante considerar los siguientes aspectos:

- La mezcla para fragmentación debe prepararse justo antes de su uso. Hay que mantener el tubo que contiene la mezcla de fragmentación de trabajo permanentemente en hielo durante el proceso.
- Prestar especial atención durante el pipeteo de la DNasa I y la Fosfatasa Alcalina, ya que estas enzimas se conservan en glicerol. Por ello pipetaremos lentamente para asegurar la exactitud de los volúmenes, e introduciremos la punta de pipeta en el reactivo el mínimo posible.
- La mezcla para fragmentación o *Working Fragmentation Mix* siempre se prepara para 24 reacciones.
- Debe desecharse toda porción de mezcla de fragmentación de trabajo no utilizada.
- La DNasa se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es recomendable sacarla del congelador justo antes de ser usada y guardarla inmediatamente después. Se pueden preparar alícuotas de 20-25  $\mu\text{L}$  de la DNasa para mejorar su estabilidad, evitando así procesos de congelación/descongelación.
- Una vez añadida la mezcla de fragmentación a los tubos que contienen los dos amplicones ya mezclados, es preciso mantenerlos en el baño de agua helada.

Procedimiento:

1. Se prepara una solución de EDTA 20mM, añadiendo 1mL de 0.5M EDTA a 24 mL de agua desionizada y mezclando bien. Esta solución es estable durante 6 meses cuando se almacena a una temperatura de  $2-8^{\circ}\text{C}$  en un recipiente limpio.
2. Hay que preparar la Mezcla de Fragmentación o *Working Fragmentation Mix* para 24 reacciones, pipeteando los volúmenes indicados en la tabla 4, en el orden especificado, en un tubo de 2,0 mL y en el baño de agua helada. Si se van a realizar menos de 24 reacciones de fragmentación, se desecha la mezcla de fragmentación de trabajo sobrante. Se utilizan las sustancias DNasa I recombinante, exenta de RNasa, de Roche Diagnostics, y la fosfatasa alcalina y la transferasa terminal recombinante de Roche Applied Science. Las unidades de la actividad de la enzima DNasa I pueden variar entre proveedores. Roche Diagnostics define una unidad de actividad según *Kunitz* como la actividad

enzimática que ejerce un aumento de la absorbancia de 0,001/min cuando las condiciones del ensayo son de 1 ml a 260 nm.

**Tabla 4.** Reactivos y volúmenes para la fragmentación.

<b>MEZCLA PARA LA FRAGMENTACION (en hielo)</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 24 Reacciones</b>
Agua, exenta de nucleasa	191.4 $\mu$ L
EDTA 20mM	3.3 $\mu$ L
Fosfatasa Alcalina 1 U/ $\mu$ L	22 $\mu$ L
DNase I 10 U/ $\mu$ L	3.3 $\mu$ L
<b>VOLUMEN TOTAL (<math>\mu</math>L)</b>	<b>220 <math>\mu</math>L</b>

3. Someter muy brevemente a vórtex durante 1 segundo el tubo con la mezcla de fragmentación. Hacer un pulso de centrifuga y mantenerla en hielo.
2. Colocar la segunda gradilla con los nuevos tubos de fragmentación en el baño de agua helada. Se necesita un tubo de reacción por cada muestra o control.
3. Añadir 8  $\mu$ L de mezcla de fragmentación a cada uno de los tubos que ya contienen 8  $\mu$ L del amplicón de la Working Master Mix A y 8  $\mu$ L del amplicón de la Working Master Mix B. Al dispensar en cada tubo homogeneizar suavemente con la punta de la pipeta tres veces. Usar una punta con filtro para cada muestra y control. Tapar los tubos de reacción.
4. Comprobar los volúmenes en los tubos de reacción antes de insertar la gradilla en el termociclador. Si los volúmenes no son iguales, se deberán volver a pipetear los 8  $\mu$ L de los amplicones de la Working Master Mix A y de la Working Master Mix B del correspondiente control o muestra, junto con 8  $\mu$ L de mezcla de fragmentación.
5. Transferir de inmediato la gradilla de fragmentación al termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 previamente programado con el protocolo para la fragmentación: **20 min 25°C + 10 min 95°C + 4°C Indefinidamente.**
6. Colocar la gradilla con los tubos de amplificación en el termociclador y comprobar que todos los tubos estén correctamente tapados.

7. Seleccionar el Método de fragmentación y presionar *START*. Comprobar que las opciones *Ramp Speed* y *Reaction Volume* se encuentran programadas como “*MAX*” y “*24 $\mu$ L*” respectivamente. Pulsar *START* nuevamente.
8. Comprobar la hora de finalización de la fragmentación. El proceso dura unos 35 minutos.
9. Una vez completada la fragmentación proceder inmediatamente con el marcaje con biotina, ya que no es posible almacenar el producto.

#### **III.5.1.6. Marcaje con biotina.**

Antes de comenzar el marcaje con biotina en el que seguiremos trabajando en un baño frío debemos considerar los siguientes aspectos:

- Reunir todos los componentes de la mezcla de trabajo para el marcado o *Working Labeling Mix*.
- Retirar del termociclador la gradilla con los amplicones fragmentados.
- Mantener encendido el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 para la incubación del marcaje.

##### **III.5.1.6.1. Preparación de la mezcla de marcado o *Working Labeling Mix*.**

Es importante tener en cuenta que la mezcla para el marcaje con biotina debe prepararse justo antes de utilizarla. Además hay que mantener el tubo que contenga la mezcla en hielo durante su preparación y uso. Debe desecharse la mezcla de marcado que no ha sido utilizada. Tener mucho cuidado en pipetear correctamente y asegurarse que las pipetas estén bien calibradas, es un punto vital en este paso.

Procedimiento:

1. Preparar la mezcla para el marcaje con biotina pipeteando los volúmenes indicados en la tabla siguiente en el orden especificado en un tubo de 2 mL mantenido en el baño de agua helada. Calcular los volúmenes adecuados de cada

reactivo mediante la relación de la tabla siguiente, considerando n° de muestras + 1 control positivo + 1 control negativo.

**Tabla 5.** Reactivos y volúmenes para el marcado con biotina.

<b>MEZCLA PARA MARCADO (en hielo)</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1 reacción</b>
<b>Tampón de Reacción con Transferasa Terminal 5X (TdT buffer)</b>	6.8 µL
<b>CoCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	0.8 µL
<b>Reactivo de marcado por TdT AmpliChip (TdT Kit AmpliChip)</b>	0.8 µL
<b>Transferasa Terminal recombinante (400 U/µL) (TdT)</b>	1.6 µL
<b>TOTAL (µL)</b>	<b>10 µL</b>

- Someter brevemente a vórtex la mezcla, hacer un pulso de centrifuga (tener en cuenta que el volumen está muy ajustado) y mantenerla en el baño de agua helada hasta que vaya a ser utilizada.
- Retirar las tapas de los tubos de reacción de fragmentación evitando formar aerosoles.
- Añadir 10 µL de *Working Labeling Mix* a cada una de los tubos que contienen 24 µL del amplicón fragmentado. Mezclar suavemente cada muestra o control con la punta de la pipeta tres veces. Utilizar una punta con filtro para cada muestra y control. Es imprescindible mantener todos los tubos de la gradilla en el baño de agua helada mientras se les añade la mezcla de marcaje.
- Tapar los tubos de reacción con tapas nuevas. Comprobar los volúmenes (34 µL) de cada uno de los tubos de la gradilla antes de insertarla en el termociclador. Si los volúmenes no son iguales, comprobar si se ha añadido la mezcla de marcado a cada tubo. Si no es posible determinar por qué los volúmenes son diferentes, se deberán volver a mezclar los amplicones de la Working Master Mix A y de la Working Master Mix B de la correspondiente muestra o control así como repetir los pasos de fragmentación y marcaje. No es necesario volver a amplificar la muestra o control.

6. Transferir inmediatamente la gradilla al termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 previamente programado para el protocolo de incubación de marcaje: **35 min 37°C + 5 min 95°C + 4°C indefinidamente.**
7. Colocar la gradilla con los tubos de amplificación en el termociclador y comprobar que todos los tubos estén correctamente tapados.
8. Seleccionar el Método de marcaje ya programado y presionar *START*. Comprobar que las opciones *Ramp Speed* y *Reaction Volume* se encuentran programadas como “*MAX*” y “*34μL*” respectivamente. Pulsar *START* nuevamente.
9. Comprobar la hora de finalización de la fragmentación. El proceso dura aproximadamente 45 minutos.
10. Una vez completado el marcaje del amplicón fragmentado, retirar la gradilla del termociclador y colocarla en una base. Almacenar la gradilla a una temperatura entre 2 y 8°C durante un tiempo máximo de 18 horas hasta el momento de realizar la hibridación de los microarrays. Los productos amplificados, fragmentados y marcados se pueden almacenar a -20°C durante un tiempo máximo de 1 semana.

### **III.5.1.7. Preparación de Tampón de Hibridación, Solución de Tinción y Tampón de Lavado.**

#### **III.5.1.7.1. Consideraciones generales.**

- Trabajar en baño de agua helada.
- Reunir todos los reactivos y consumibles necesarios para realizar las distintas soluciones.
- Comprobar que los amplicones fragmentados y marcados estén completamente descongelados (si han sido almacenados a -20°C).
- Precalentar el termobloque a 95°C al menos 15' antes de su uso.
- Calcular los volúmenes necesarios de cada componente para preparar los tres tampones según las tablas 6, 7 y 8.

### III.5.1.7.2. Preparación del Tampón de Hibridación.

La solución de Triton X-100 al 10%, el conjugado de estreptavidina y R-ficoeritrina, y la solución de tinción son sensibles a la luz. Deben ser almacenados en un recipiente que los proteja de la exposición a la luz (y envueltos en papel de aluminio durante su uso).

**Tabla 6.** Reactivos y volúmenes para el Tampón de Hibridación.

<b>TAMPON DE HIBRIDACION</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1 reacción</b>
<b>SSPE 20X</b>	125 $\mu$ L
<b>Triton X-100 al 10%</b>	2.50 $\mu$ L
<b>AmpliChip B1 Oligo</b>	50 $\mu$ L
<b>Solución de Denhardt 50X</b>	10 $\mu$ L
<b>Azida sódica al 5%</b>	9 $\mu$ L
<b>Agua desionizada</b>	303.50 $\mu$ L
<b>VOLUMEN TOTAL del Tampón de Hibridación</b>	<b>0.500 mL</b>

1) Preparar Azida Sódica al 5% añadiendo 5 g de azida sódica a 100 mL de agua.

2) Preparar la solución de Triton X-100 al 10% pipeteando lentamente 10 mL de Triton X-100 (es una solución muy viscosa) en un recipiente vacío y limpio, y añadiendo después 90 mL de agua. Mezclarlos bien (vortear hasta que el Triton X-100 esté en solución). Esta solución es estable durante 6 meses a partir de la fecha de preparación siempre que se almacene entre 15 y 30°C en un recipiente de plástico cerrado, y protegido de la exposición a la luz.

3) Preparar Tampón de Hibridación añadiendo a un tubo de 15 mL los volúmenes de los distintos componentes, en el orden indicado en la tabla anterior y mezclándolos mediante inversión. Esta solución es estable durante 6 meses a partir de la fecha de preparación, siempre que se almacene a una temperatura entre 2 y 8°C en un recipiente de plástico limpio y cerrado. Aunque lleve Triton X-100 al 10% no es necesario protegerlo de la luz.

**III.5.1.7.3. Preparación de la Solución de Tinción.**

1) Preparar la solución de tinción añadiendo a un tubo de 15 mL envuelto en papel de aluminio los volúmenes de los distintos componentes en el orden indicado en la tabla 7, considerando el número de reacciones total. La solución de tinción es fotosensible. Es estable durante 6 meses a partir de la fecha de preparación, si se almacena entre 2 y 8°C en un recipiente de plástico cerrado y protegido de la luz.

2) Mezclar por vórtex durante 15 segundos.

**Tabla 7.** Reactivos y volúmenes para la Solución de Tinción.

<b>SOLUCION DE TINCION</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1 reacción</b>
<b>SSPE 20X</b>	146 $\mu$ L
<b>Albumina sérica bovina acetilada (20mg/mL)</b>	26 $\mu$ L
<b>Conjugado de estreptavidina y R-ficoeritrina (1mg/mL) SA-PE</b>	5.2 $\mu$ L
<b>Azida sódica al 5%</b>	9.4 $\mu$ L
<b>Agua desionizada</b>	334.4 $\mu$ L
<b>VOLUMEN TOTAL (mL)</b>	<b>0.521 mL</b>

**III.5.1.7.4. Preparación de la Solución de Lavado.**

En este caso prepararemos al menos un litro de Tampón de Lavado añadiendo el volumen adecuado de los distintos componentes en el orden indicado en la tabla 8. Después homogenizaremos bien por inversión.

**Tabla 8.** Reactivos y volúmenes para la Solución de Lavado.

<b>SOLUCION DE LAVADO</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen 1 L</b>
<b>SSPE 20X</b>	150 mL
<b>Triton X-100 al 10%</b>	0.5 mL
<b>Azida sódica al 5%</b>	18 mL
<b>Agua desionizada</b>	831.5 mL
<b>VOLUMEN TOTAL (L)</b>	<b>1.0 L</b>

**III.5.1.7.5. Adición del Tampón de Hibridación a las muestras y controles. Dispensación de la Solución de Tinción.**

Para añadir el Tampón de Hibridación a las muestras y controles se seguirán los siguientes pasos:

- 1) Rotular un tubo eppendorf de 1.5 mL para cada muestra o control.
- 2) Añadir 500  $\mu$ L de Tampón de Hibridación a cada tubo.
- 3) Mezclar cada muestra/control procesados con la punta de la pipeta tres veces antes de añadir 20  $\mu$ L de cada uno de ellos a cada tubo rotulado convenientemente. Tapar los tubos y agitar en vórtex durante 10 segundos. Si la solución de hibridación con el amplicón no se va a procesar inmediatamente, se deberá mantener en el baño de agua helada hasta su desnaturalización.
- 4) Incubar las muestras a 95°C durante 10 minutos en el termobloque.
- 5) Retirar los tubos del termobloque e introducirlos inmediatamente en el baño de agua helada. Las muestras están listas para ser hibridadas.

Para dispensar la Solución de Tinción se añaden por cada muestra o control 500  $\mu$ L a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Como es sensible a la luz, envolveremos cada tubo con papel de aluminio y lo introduciremos en un baño de agua helada con tapadera, la solución de Tinción esta lista para ser cargada en la estación de fluidos.

### III.5.1.8. Hibridación y Tinción del array.

Los fragmentos de ADN objetivo del CYP450 rotulados con biotina se añaden a un tampón de hibridación que contiene la solución de oligonucleótidos B<sub>1</sub> AmpliChip que sirve como control de la hibridación. La mezcla se hibrida con los oligonucleótidos ubicados en el microarray para el AmpliChip CYP450 usando la estación fluídica GeneChip 450Dx de Affymetrix y un protocolo específico para la prueba AmpliChip CYP450. El microarray para AmpliChip CYP450 hibridado se lava y se tiñe con un colorante fluorescente (ficoeritrina) conjugado con estreptavidina.

La tecnología de fabricación de los microarrays para AmpliChip CYP450 combina métodos fotolitográficos y química combinatoria. (Fodor *et al.*, 1993; Pease *et al.*, 1994). La síntesis sobre una superficie de vidrio de más de 15000 sondas oligonucleótidas diferentes permite analizar cadenas tanto homosenrido como antisenrido de una muestra de ADN objetivo amplificado. Dentro de la superficie de 20 x 20  $\mu\text{m}^2$  del microarray de sondas, 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. El microarray para AmpliChip CYP450 utiliza aproximadamente 240 sondas para detectar con exactitud cada uno de los polimorfismos. Los microarray de sondas se fabrican en una serie de ciclos mediante química combinatoria fotodirigida. Los substratos de vidrio se recubren con acopladores que contienen grupos protectores fotolábiles. A continuación se aplica una máscara que deja expuestas porciones seleccionadas del microarray de sondas. Mediante iluminación se eliminan los grupos protectores fotolábiles, lo que permite la adición selectiva de fosforamidita nucleósida únicamente a los sitios previamente expuestos. A continuación, se aplica una máscara diferente y se lleva a cabo nuevamente el ciclo de iluminación y acoplamiento químico. Mediante la repetición de este ciclo, se sintetiza un conjunto específico de sondas oligonucleótidas en el que cada tipo de sonda tiene una ubicación conocida. Los microarrays de sondas terminados se envasan en cartuchos compatibles con la estación fluídica GeneChip 450Dx.

Consideraciones previas:

- Coger todas las soluciones preparadas anteriormente para ser utilizadas en la Estación de Fluidos 450Dx de Affymetrix Molecular Diagnostics (Figura 17). Esto incluye el

Tampón de Hibridación que contiene el amplicón ya preparado, la Solución de Tinción y el Tampón de Lavado.

- Disponer los tubos de plástico de *Wash A* y *Wash B* situados a mano derecha de FS 450Dx en el recipiente que contiene el Tampón de Lavado preparado previamente.
- Situar el tubo que está marcado como “*Water*” en el recipiente que contiene el agua desionizada.
- Situar el tubo que está marcado como “*Waste*” en el recipiente vacío marcado como “*Waste.*”



**Figura 17.** Estación de Fluidos 450Dx.

#### III.5.1.8.1. Creación de Peticiones.

1) Conectar la Estación de Fluidos 450Dx previamente. Encender el ordenador y entrar con la contraseña propia en el *software* AMDS (Affymetrix Molecular Diagnostics Software).

2) Seleccionar el icono *Active Worklist* situado en el panel de aplicaciones de la columna izquierda de la pantalla.

3) Para crear o editar una petición: pinchar en el icono *create* (aparece la pantalla **Enter Test Request**).

4) Entrar la identificación de cada muestra en la columna *Specimen ID*, y seleccionar el test Roche AmpliChip CYP450 en el desplegable de la columna Assay Name.

- 5) Al terminar con todas las muestras, seleccionar el icono **Submit**.

#### III.5.1.8.2. Registro de Peticiones.

- 1) Seleccionar el icono **Registration** situado en el panel de aplicaciones de la columna izquierda de la pantalla.

- 2) Seleccionar la muestra deseada en el campo **Specimen ID**: se abre la ventana Test Additional Information, en la que se debe definir el CYP450 Test Report como **CYP2D6 and CYP2C19**. El resto de campos son opcionales. Dar a **Save** y luego a **Close** para cerrar la ventana.

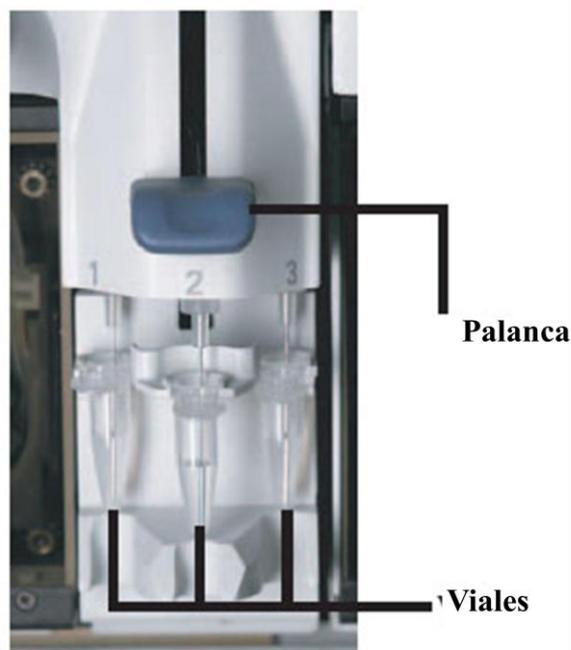
- 3) Seleccionar el campo **Array ID** de la muestra deseada, y entrar el código de barras apropiado del array a usar en esta muestra (con el lector o manualmente).

- 4) Dar a **Save** y **Complete Step** para guardar y pasar a la siguiente operación.

#### III.5.1.8.3. Cebado de la Estación de Fluidos.

- 1) Seleccionar el icono **Fluidics** situado en el panel de aplicaciones de la columna izquierda.

- 2) Cargar 3 viales vacíos de 1.5 mL en cada uno de los cuatro módulos de la estación. (Figura 18).



**Figura 18.** Viales y palanca de agujas de la Estación de Fluidos 450Dx.

- 3) Dar al icono  en la barra de tareas.
- 4) Seleccionar en la columna **Assay** el test Roche AmpliChip CYP450.
- 5) Verificar que están marcados para cebar los 4 módulos.
- 6) Dar al icono . Después de verificar que todo esté cargado correctamente, dar a **Yes** y empezará el proceso de cebado.
- 7) Cuando el cebado esté completo (unos 15 minutos), la columna **Status** mostrará el texto *Priming Complete*.
- 8) Dar al icono  en la barra de tareas para cerrar la ventana **Fluidic Station Setup**.
- 9) Descargar los viales usados en los 4 módulos para el cebado.
- 10) Cargar para cada muestra su vial con tampón de hibridación en la posición 1, el vial con la solución de tinción en la posición 2, y un vial vacío en la 3. (Figura 18).

#### III.5.1.8.4. Puesta en marcha de la Estación de Fluidos.

- 1) Cargar un array de AmpliChip CYP450, debidamente rotulado con la identificación de la muestra, en el módulo deseado. (Figura 19).



**Figura 19.** Array AmpliChip CYP450.

- 2) En el apartado *Fluidics Worklist*, resaltar la fila de una muestra para entrar el **Station #** (el 1) y el **Module #** (del 1 al 4) para el array, manualmente o con el lector de códigos de barra, prestando atención a una identificación correcta.
- 3) Repetir los pasos 1-2 para cada uno de los arrays a procesar.
- 4) Dar a **Select All**, y luego al icono  en la barra de tareas para iniciar el protocolo. El proceso dura unos 50 minutos.
- 5) Cuando se completa el proceso aparecerá el mensaje **Eject Cartridge** en las pantallas de cada módulo usado de la estación de fluidos.
- 6) Retirar los arrays de cada módulo. Es importante no cerrar el receptáculo de los arrays hasta inspeccionar visualmente cada array para verificar la ausencia de burbujas. Si no las hay, el array está preparado para ser leído. Si hay burbujas presentes, reinsertarlo en su módulo, cerrar el receptáculo y se cebará automáticamente. Repetir hasta eliminar cualquier burbuja. Cerrar cada módulo finalmente.
- 7) Retirar los viales usados.

- 8) Seleccionar las muestras procesadas y dar a **Complete Step** para pasar a la siguiente operación. Después de que se hayan purgado automáticamente los 4 módulos, el campo **Status** cambiará a **Completed**.

Si el array no se carga en el Scanner en 30 minutos es necesario almacenarlo entre 2 y 8° C protegido de la luz, durante un máximo de una semana, con los *Tough Spots* o pequeñas pegatinas colocados. (Figura 20).

Una vez finalizadas todas las hibridaciones, situar todos los tubos de lavado (no el de Waste) localizados a mano derecha de la estación de fluidos en una botella con agua desionizada. Después procederemos a cerrar el equipo desde el icono **Fluidics**, yendo a **Station Set-up**, **Shutdown Station**, y siguiendo las instrucciones de las pantallas de cada módulo cuando las vayan solicitando.

### III.5.1.9. Lectura del Array.

Tras la tinción, se realiza una lectura óptica del microarray para AmpliChip CYP450 por medio del lector óptico GeneChip Scanner 3000Dx de Affymetrix utilizando un láser que excita el rótulo fluorescente fijado a los fragmentos de ADN objetivo del CYP450 hibridados. La cantidad de luz emitida es proporcional al ADN objetivo fijado en cada ubicación del microarray de sondas. La imagen de cada una de las aproximadamente 15.000 celdas de sondas se almacena en un archivo que se utilizará para el análisis de los datos.

#### III.5.1.9.1. Procesamiento en el Escáner.

No olvidar conectar el escáner 10 minutos antes de usarlo ya que no trabajara hasta que el proceso de calentamiento no haya finalizado. A continuación se llevaran a cabo los siguientes pasos:

- 1) Colocar pegatinas pequeñas o **Tough Spots** en los dos agujeros menores localizados detrás del chip. Asegurarse que están adheridos correctamente y que queden planos, sin pliegues. Esto es necesario evitar fugas de líquido del microarray **CYP450** (Figura 20).



**Figura 20.** Colocación de los *Tough Spots* en el array.

- 2) Introducir cada Array en el carrusel del Scanner, de forma que el primero esté en la primera posición roja marcada como 1. Colocar los restantes en las siguientes posiciones. Si el microarray CYP450 Array hibridado y teñido no va a ser cargado en el autocargador para el lector óptico GeneChip en un plazo de 30 minutos se puede almacenar a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C protegido de la exposición a la luz durante un tiempo máximo de 1 semana.
- 3) Seleccionar el icono *Scanner* del panel de aplicaciones de la columna izquierda.
- 4) Dar a  en la barra de tareas. En la columna *Status* se actualizará al información a *Complete* cuando se termine el proceso individualmente para cada array.
- 5) Una vez completadas todas las lecturas, dar a *Complete Step* y retirar los arrays del Scanner.
- 6) Apagar el Escáner si no se va a usar a continuación.

### III.5.1.9.2. Visualización de los Resultados.

En este momento los AmpliChips CYP450 han sido escaneados, y los resultados están listos para ser visualizados por el *software* AMDS. Para ello pincharemos en el icono *Active Worklist* del panel de aplicaciones de la columna izquierda, y seleccionaremos para la muestra deseada el hipervínculo *Awaiting Review* de la columna

**Review Results**, para ver el informe de resultados. Este aparecerá en la pantalla de visualización de resultados, con la posibilidad de aprobarlo (**Approve**) o rechazarlo (**Reject**) según decisión del usuario, debiendo introducirse para ello la contraseña del usuario. El informe se traslada al archivo de **Non-Active Worklist**.

### **III.5.1.9.3. Determinación de los genotipos de CYP4502D6 y 2C19 y del fenotipo predicho.**

El análisis de datos se realiza en varios pasos mediante el software operativo GeneChip y el programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 v2.0 o el programa Molecular Diagnostic Software (AMDS v1.0) de Affymetrix y el programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 v3.0: En un primer paso el software AMDS sitúa automáticamente una rejilla sobre la imagen leída del microarray con el fin de demarcar las celdas de sondas individuales y calcular la intensidad media correspondiente a cada una de ellas, en segundo lugar el programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 utiliza algoritmos específicos CYP450 para analizar los patrones de intensidad y determinar el genotipo en cada uno de los sitios polimórficos especificados mediante el análisis del alcance relativo de la hibridación con sondas complementarias de secuencias mutantes y nativas incluidas en el microarray de sondas y por último el algoritmo del programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 compila la información genotípica correspondiente a cada uno de los 29 polimorfismos y la compara con las combinaciones de patrones genotípicos de alelos conocidos con el fin de identificar los correspondientes alelos en el ADN de la prueba. Si los polimorfismos corresponden a un alelo definido del gen respectivo, se denota al alelo con la nomenclatura estándar (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>).

Se genera un informe que resume la genotipificación e indica los correspondientes alelos identificados. La información genotípica se utiliza para predecir la actividad enzimática CYP2D6 y CYP2C19 del individuo conforme a las conclusiones de estudios publicados. (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>).

### III.5.1.10. Protocolo de limpieza de la Estación de Fluidos con hipoclorito sódico.

Se recomienda en el caso de volúmenes de trabajo de unas 20 muestras por semana y por modulo realizar el protocolo de limpieza con hipoclorito sódico una vez a la semana.

Para ello se preparan 500 mL de hipoclorito sódico al 0.525% (si se parte de hipoclorito sódico al 4%, se deberá coger 66 mL de esta solución en 434 mL de agua destilada).

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Disponer la botella de “Waste” de 1 litro, la botella de 500 mL con la solución de hipoclorito y una botella de 1 litro con agua destilada tal y como muestra la figura 21.
- 2) Disponer los 3 tubos de plástico de *Wash A*, *Wash B* y del agua situados a mano derecha de la estación de fluidos en el recipiente que contiene 500 mL de la solución de hipoclorito sódico.
- 3) Entrar en el menú de *System Management, In-house Service, User Service*, y en la sección *Administrator* seleccionar la estación (la 1), y dar al icono *Perform* del protocolo *Bleach* (dura unos 30 minutos).
- 4) A continuación, realizar un purgado con agua destilada, traspasando los 3 tubos de plástico al recipiente con 1 litro de agua destilada (dura unos 60 minutos).



**Figura 21.** Disposición de tubos y botellas para el protocolo de limpieza.

### **III.5.2. Determinación de los niveles plasmáticos de Tamoxifeno y sus metabolitos.**

Las determinaciones de los niveles plasmáticos de Tamoxifeno, endoxifeno y otros metabolitos se realizaron al final de cada nivel de dosis (20,40 y 60 mg), es decir, a los 4, 8 y 12 meses de la entrada en el estudio. La muestra de sangre (5 mL recogidos en tubos con EDTA) se obtuvo inmediatamente antes de la siguiente dosis de Tamoxifeno. Se separó el plasma y el suero en la hora siguiente a la obtención de la muestra mediante centrifugación a 3.000 r.p.m. respectivamente, y se almacenó a -80°C hasta la realización del análisis.

Las concentraciones plasmáticas de endoxifeno, Tamoxifeno y algunos de sus metabolitos se han realizado en la Fundación Tejerina de Madrid.

**III.5.2.1. Reactivos.**

Se utilizaron estándares de Tamoxifeno, 4-OH-tamoxifeno, N-Desmetil-Tamoxifeno, N-desmetil-4-OH-tamoxifeno (E/Z), N-óxido Tamoxifeno y estándares internos deuterados de tamoxifeno-d-5, 4-OH- Tamoxifeno d-5 N-desmetiltamoxifeno d-5, N-desmetil 4-OH-Tamoxifeno (E/Z)-d5 adquiridos a Toronto Research Chemicals.

El metanol, ACN y agua (calidad LC-MS) se obtuvieron de LAB-SCAN; el ácido fórmico de FLuka Analytical.

También se utilizaron muestras de suero humano fresco carentes de fármaco para la validación.

**III.5.2.2. Instrumentación.****III.5.2.2.1. HPLC.**

Para la separación cromatográfica se utilizó un sistema HPLC de Agilent 1200 series (equipado con desgasificador G 1379 B, bomba binaria (600 bares) G 1312A, inyector automático H-ALS G1367B, y horno para columnas G 1316A.

La fase móvil "A" utilizada consistió en una solución de agua al 0.1% de ácido fórmico y la fase "B" en ACN al 0.1% de ácido fórmico.

Se hicieron pasar las fases móviles A y B a través de una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3.5 µm) de Agilent (U.S.A.), con un gradiente que se presenta en la tabla 9.

**Tabla 9.** Tabla HPLC.

	TIME	B%	FLOW	PRESSURE
<b>1</b>	0	35	0.2	400
<b>2</b>	7	50	0.2	400
<b>3</b>	15	75	0,2	400
<b>4</b>	20	35	0.2	400

Post time: 6.5 minutos.

La separación se efectuó a una temperatura mantenida de 30°C en columna. Se inyectaron volúmenes de 10 µL con el inyector automático con posterior lavado de la aguja durante 14 segundos, con una solución de acetonitrilo (ACN)/Agua. La duración del método fue de 20 minutos, con un post-time de 6.5 minutos, para equilibrado de columna.

Para la detección se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (6410 Triple Quad LC/MS), de Agilent Technologies U.S.A., equipado con una fuente de ionización E.S.I. funcionando en modo positivo. Para monitorizar los iones se optimizó una reacción múltiple de cuantificación (*multiple reaction monitoring* MRM) con la ayuda del software Mass Hunter, de Agilent Technologies.

La resolución del triple cuadrupolo oscilaba entre 0.7 a 1 Da. Los parámetros de fuente y transiciones de masas se enuncian a continuación.

#### **III.5.2.2.2. Preparación de los estándares de calibración, controles de calidad y soluciones de estándares internos.**

Se prepararon soluciones stock para estándares de calibración, estándares internos y controles de calidad.

**Preparación de estándares de calibración:** Partiendo de soluciones de 1mg/mL para cada uno de los compuestos, se prepara una solución pool diluida en metanol que contenía concentraciones de 10000 ng/mL para Tamoxifeno, N- desmetil Tamoxifeno, Tamoxifeno N-óxido, N-desmetil 4 OH Tamoxifeno; y de 5000 ng/mL para el 4-OH Tamoxifeno.

Para la preparación de los diferentes calibradores se siguió el mismo procedimiento que se describirá en la preparación de muestras.

**Preparación de controles de calidad:** se preparó una solución stock igual a la de los calibradores, a partir de la cual y siguiendo el mismo procedimiento de la preparación de muestras, se construyeron los diferentes controles de calidad.

**Preparación de internos:** Se preparó una mezcla de solución stock de estándares internos, diluida en ACN con el fin de obtener una solución en uso con utilidad en el pretratamiento de muestras (Tamoxifeno-d5, 4-OH- Tamoxifeno d5, N- desmetil-tamoxifeno-d5, N-desmetil-4OH- tamoxifeno-d5 (mezcla E/Z 1:1).

**Preparación de muestras:** a un volumen de 100 µL de suero, se le añade una solución de 284 µL de ACN 1% de Fórmico + 16 µL de la solución de compuestos deuterados. A continuación se vortea 20 segundos y se centrifuga 5 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante se hace pasar por columna HybridSPE (Supelco) y el eluido se traspasa a microviales que se encapsulan y conservan entre 2-8°C para su procesamiento.

### III.5.2.2.3. Procedimiento de validación.

#### **Linealidad.**

Se preparan por duplicado 11 estándares de calibración por compuesto, que se analizan entre series independientes. Las curvas de calibración se ajustan mediante regresión lineal de mínimos cuadrados, utilizando el inverso de la concentración al cuadrado ( $1/X^2$ ). Para evaluar la linealidad, las concentraciones calculadas de todas las series debían encontrarse entre el 85 y 115% de las concentraciones teóricas. El límite inferior del nivel de cuantificación debía de ser 10 veces superior a la respuesta de una muestra en blanco.

#### **Exactitud y precisión.**

Se determinaron la exactitud y la precisión intra e inter-ensayo analizando 3 réplicas de cada uno de los controles de calidad, con niveles de concentración bajo, medio y alto. Se calculó la concentración de cada muestra de control de calidad utilizando estándares de calibración analizados por duplicado en la misma serie. La exactitud debía situarse entre el 85 y el 115% con respecto a las concentraciones teóricas. La precisión no debía exceder del 115% del coeficiente de variación (CV).

#### **Recuperación y supresión de iones.**

Para los analitos se determinaron recuperaciones globales en tres niveles de concentración por triplicado, y para los estándares internos en un nivel.

**Arrastre.**

Se determinó el arrastre inyectando una muestra procesada de suero humano control tras una muestra con la máxima concentración de calibrador (ULQ). Las áreas del blanco debían situarse en el 20% del área del nivel LLQ.

**Especificidad y selectividad.**

Se utilizaron 4 lotes individuales de suero humano con el fin de determinar si los constituyentes endógenos interfieren con el ensayo, además de un blanco por duplicado y una muestra añadida en el LLQ. Las áreas de los picos co-eluidas con los analitos deberían situarse en el 20 % de la muestra LLQ en cada uno de los 4 lotes de suero. En el caso de los blancos las áreas co-eluidas deberían de situarse en el 5% del área de la respuesta media de los IS.

**III.5.2.2.4. Resultados y discusión.**

Ante la variabilidad de polaridades de los analitos estudiados se utilizó una columna C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3.5 µm) de Agilent, con una temperatura de 30°C. Se utilizaron iones moleculares de M+ H (ionización positiva) (Figura 22), y se optimizaron estos como subproductos para fabricar un método MRM con la suficiente sensibilidad y selectividad.

Acquisition										
Source   Chromatogram   Instrument   Diagnostics										
Scan segments										
Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Polarity	
▶ 4OH Tamoxifeno D5	<input checked="" type="checkbox"/>	393	Unit	72	Unit	50	160	25	Positive	
4OH Tamoxifeno	<input type="checkbox"/>	388	Unit	72	Unit	50	160	25	Positive	
Endoxifeno D5	<input checked="" type="checkbox"/>	379	Unit	58	Unit	50	140	20	Positive	
Tamoxifeno D5	<input checked="" type="checkbox"/>	377	Unit	72	Unit	50	160	25	Positive	
Endoxifeno	<input type="checkbox"/>	374	Unit	58	Unit	50	140	20	Positive	
Tamoxifeno	<input type="checkbox"/>	372	Unit	72	Unit	50	160	25	Positive	
N-desmetil Tamoxi D5	<input checked="" type="checkbox"/>	363	Unit	58	Unit	50	120	20	Positive	
N-desmetil Tamoxi	<input type="checkbox"/>	358	Unit	58	Unit	50	120	20	Positive	

**Figura 22.** Iones con ionización positiva.

**Linealidad:** Todas las curvas de calibración se construyeron utilizando un factor  $1/X^2$  con coeficientes de variación inferiores al 15%, y exactitudes entre el 85 y 115%. Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) fueron en todos los casos mayores de 0.99.

**Exactitud y precisión:** las exactitudes y precisiones intraensayo fueron en todos los casos inferiores al 15%.

**Recuperación, Supresión de Iones, Arrastre:**

- la recuperación de los analitos se determinó en tres niveles de concentración, situándose en todos los casos entre el 95 y el 105 %.
- En ningún compuesto estudiado se detectó supresión iónica, por lo que puede deducirse que esta es cercana al 100%.
- El área del pico de la muestra procesada en blanco se situaba por debajo del 20% de la muestra LLQ.

**Especificidad y Selectividad:** Los cromatogramas de los 4 lotes de suero humano control no contenían ningún pico de co-elución mayor del 20% del área del LLQ de todos los analitos, y ningún pico de co-elución mayor del 5% del área de todos los estándares internos.

### III.6. METODO ESTADISTICO EMPLEADO.

El primer paso para la realización del tratamiento estadístico es la creación de una base de datos. En el caso de la presente Tesis se ha creado una base de datos, utilizando el paquete de programas SPSS versión 15.0, que también se ha usado para realizar el tratamiento estadístico de los mismos.

Los procedimientos para analizar dichos datos han sido los siguientes:

### **III.6.1. Estadística descriptiva.**

Para todas las variables cuantitativas se ha empleado en primer lugar el procedimiento de estadística descriptiva (Procedimiento Frecuencias) para hallar los parámetros muestrales fundamentales: Media, desviación típica, error estándar de la media y los valores mínimo y máximo observados en la muestra para cada subgrupo considerado así como el número de casos sobre los que se han realizado los cálculos.

De igual modo mediante el módulo de gráficos se representan las distribuciones de frecuencias de dichas variables mediante los correspondientes diagramas de barras y barras de error con las medias +/- el error estándar de la media para cada una de las variables continuas en los distintos grupos analizados.

### **III.6.2. Estadística inferencial.**

Con el fin de realizar las comparaciones de los diferentes parámetros analizados con el procedimiento más correcto posible se deben comprobar los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas y también si existe alguna observación extrema que pueda conducirnos a un resultado erróneo.

En primer lugar se ha aplicado para cada variable cuantitativa continua y cada grupo los test de normalidad de Kolmogorov- Smirnov y Shapiro-Wilk, dentro del módulo de EXPLORAR. Si dicho test nos da un resultado significativo indica que, en la población de la cual procede la muestra considerada, la variable estudiada no se comporta según el modelo de la distribución normal. En estos casos aplicaremos transformaciones apropiadas a los datos y si no se corrige la no normalidad se utilizan procedimientos no paramétricos para estudiar las cuestiones planteadas acerca de esas variables no normales.

Como nuestro interés se centra en la comparación de las variables de estudio medidas sobre las mujeres controles y las de respuesta “lenta” a diversas dosis el procedimiento consistirá en test para muestras independientes( Test de Student o Welch en caso de variables normales o test de Wilcoxon y Mann-Whitney cuando no se cumple la normalidad) comparando las mujeres controles con las patológicas a las dosis de 20 , 40 y

60 mg , aplicando la corrección de Bonferroni debido a las múltiples comparaciones efectuadas. Para comparar las “patológicas” (metabolizadoras lentas) entre sí a las distintas dosis (20,40 y 60 mg) se ha empleado el test de Friedman (no paramétrico) para varias muestras dependientes o relacionadas, dado el bajo número de mujeres en dicha muestra, lo que hace no fiable el supuesto de normalidad. En caso de significación se realizan las comparaciones múltiples dos a dos con la correspondiente corrección de Bonferroni.

En general, para poder afirmar a un error global alfa del 0,05 en que variables del total se presenta significación se ha de aplicar la llamada “penalización” de Bonferroni que consiste en dividir el error  $\alpha$  por el número de variables a comparar. Para que una comparación sea significativa deberá serlo para  $\alpha/k$ , siendo k el número de variables que se comparan.

En todos los test aplicados un resultado se considera significativo y por tanto indicativo de que podemos concluir que existe diferencia entre ambas poblaciones cuando el valor P (nivel de significación) sea inferior ó igual a 0,05, (\*) considerándose muy significativo cuando P sea menor que 0.01 (\*\*) y altamente significativo si P es menor que 0,001(\*\*\*). Cuando no hay significación pero P está comprendido entre 0,05 y 0,10 lo indicaremos como que existen “indicios de significación”. En estos casos la no significación puede ser debida a un insuficiente tamaño de muestra, lo que requeriría aumentar dicha muestra y repetir el test.



## **IV. RESULTADOS**

---

## **IV. RESULTADOS.**

### **IV.1. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.**

La prueba AmpliChip CYP450 se basa en cinco procesos principales: amplificación mediante PCR del ADN purificado; fragmentación y rotulado de los productos amplificados; hibridación de los productos amplificados al microarray y tinción de los productos fijados; lectura óptica del microarray; y determinación del genotipo CYP450 y el fenotipo predicho.

La prueba AmpliChip CYP450 ha sido diseñada para identificar secuencias de ácidos nucleicos específicas y evaluar la presencia de polimorfismos de secuencia conocidos mediante el análisis del patrón de hibridación con una serie de sondas específicamente complementarias de las secuencias bien nativas o mutantes. En el análisis se utilizan microarrays de sondas oligonucleótidas sintetizados sobre un substrato de vidrio.

#### **IV.1.1. Amplificación mediante PCR.**

##### **IV.1.1.1. Selección del objetivo.**

La prueba AmpliChip CYP450 amplifica los genes CYP2D6 y CYP2C19 en dos reacciones separadas que posteriormente se combinan tras la amplificación mediante PCR. La reacción que contiene la mezcla de iniciadores A para CYP450 utiliza iniciadores que generan un producto amplificado que comprende la región reguladora y regiones codificadoras del gen CYP2D6 así como un producto específico de la duplicación del gen CYP2D6 cuando esté presente en la muestra o en el control. La reacción que contiene la mezcla de iniciadores B para CYP450 utiliza iniciadores que generan un producto amplificado que comprende del exón 4 al exón 5 del gen CYP2C19 así como un producto específico de la delección del gen CYP2D6 cuando esté presente en la muestra o en el control.

#### IV.1.1.2. Amplificación del objetivo.

Se utiliza una mezcla propietaria de ADN polimerasas AmpliTaq® Gold para conseguir tanto la amplificación con “*hot start*” del ADN objetivo del CYP450 como una actividad correctora para la eficiente amplificación de secuencias objetivo largas. En primer lugar, se calienta la mezcla de reacción PCR para activar las ADN polimerasas AmpliTaq® Gold, desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias objetivo de los iniciadores. A medida que la mezcla se enfría, los iniciadores se templan a las secuencias de ADN objetivo. Las ADN polimerasas AmpliTaq® Gold, en presencia de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) y de un exceso de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP), prolongan los iniciadores templados a lo largo de las plantillas del objetivo para generar una molécula de ADN bicatenario denominada amplicón. Este proceso se repite durante 35 ciclos para doblar en cada ciclo la cantidad de ADN amplicón. La amplificación tiene lugar únicamente en la región de los genes CYP2D6 y CYP2C19 situada entre los iniciadores; no se amplifica el genoma completo.

#### IV.1.1.3. Amplificación selectiva.

La amplificación selectiva del ácido nucleico objetivo presente en la muestra se consigue en la prueba AmpliChip CYP450 usando la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y trifosfato de deoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina (*Longo et al., 1990*), pero no del ADN que contiene deoxitimidina. El ADN natural carece de deoxiuridina, que sin embargo está siempre presente en los amplicones debido al empleo de trifosfato de deoxiuridina como uno de los dNTP del reactivo de mezcla maestra (Master Mix); por lo tanto, sólo el amplicón contiene deoxiuridina. La deoxiuridina hace al amplicón contaminante susceptible de destrucción por la enzima AmpErase previamente a la amplificación del ADN objetivo. Asimismo, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar entre la activación inicial de la mezcla maestra mediante la adición de magnesio y el inicio de la ciclación térmica, mejorando así la especificidad y la sensibilidad de la prueba. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo Master Mix, cataliza la escisión del ADN en las posiciones correspondientes a los residuos de deoxiuridina abriendo la cadena de deoxirribosa en la posición C-1.

Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN no pueda ya amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55°C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo formado durante la amplificación.

#### **IV.1.2. Fragmentación y rotulado de los productos amplificados.**

Los segmentos de ADN amplicón obtenidos para cada muestra en las dos reacciones de amplificación independientes se combinan y se escinden mediante incubación con la mezcla de fragmentación de trabajo. La fragmentación se lleva a cabo por acción de la DNasa I recombinante, exenta de RNasa, y genera pequeños fragmentos de ADN con un tamaño medio de 50 a 200 nucleótidos. La fosfatasa alcalina presente en la mezcla de fragmentación de trabajo destruye los dNTP residuales de las reacciones de amplificación. Los segmentos de ADN amplicón fragmentados se rotulan a continuación con biotina en su extremo terminal 3' mediante la acción de una transferasa terminal usando el reactivo de rotulado por TdT AmpliChip como substrato.

#### **IV.1.3. Hibridación y tinción del microarray para AmpliChip CYP450**

Los fragmentos de ADN objetivo del CYP450 rotulados 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 el microarray para AmpliChip CYP450 usando la estación fluídica GeneChip 450Dx de Affymetrix y un protocolo específico para la prueba AmpliChip CYP450. El microarray para AmpliChip CYP450 hibridado se lava y se tiñe con un colorante fluorescente (ficoeritrina) conjugado con estreptavidina.

La tecnología de fabricación de los microarrays para AmpliChip CYP450 combina métodos fotolitográficos y química combinatoria (*Fodor et al., 1993; Pease et al., 1994*). La síntesis sobre una superficie de vidrio de más de 15.000 sondas oligonucleótidas diferentes permite analizar cadenas tanto homosenrido como antisenrido de una muestra de ADN objetivo amplificado. Dentro de la superficie de 20 x 20  $\mu\text{m}^2$  del microarray de sondas, 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. El

microarray para AmpliChip CYP450 utiliza aproximadamente 240 sondas para detectar con exactitud cada uno de los polimorfismos. Los microarrays de sondas se fabrican en una serie de ciclos mediante química combinatoria fotodirigida. Los substratos de vidrio se recubren con acopladores que contienen grupos protectores fotolábiles. A continuación se aplica una máscara que deja expuestas porciones seleccionadas del microarray de sondas. Mediante iluminación se eliminan los grupos protectores fotolábiles, lo que permite la adición selectiva de fosforamidita nucleósida únicamente a los sitios previamente expuestos. A continuación, se aplica una máscara diferente y se lleva a cabo nuevamente el ciclo de iluminación y acoplamiento químico. Mediante la repetición de este ciclo, se sintetiza un conjunto específico de sondas oligonucleótidas en el que cada tipo de sonda tiene una ubicación conocida. Los microarrays de sondas terminados se envasan en cartuchos compatibles con la estación fluidica GeneChip 450Dx.

#### **IV.1.4. Lectura óptica del microarray para AmpliChip CYP450.**

Tras la tinción, se realiza una lectura óptica del microarray para AmpliChip CYP450 por medio del lector óptico GeneChip Scanner 3000Dx de Affymetrix utilizando un láser que excita el rótulo fluorescente fijado a los fragmentos de ADN objetivo del CYP450 hibridados. La cantidad de luz emitida es proporcional al ADN objetivo fijado en cada ubicación del microarray de sondas. La imagen de cada una de las aproximadamente 15.000 celdas de sondas se almacena en un archivo que se utilizará para el análisis de los datos.

#### **IV.1.5. Determinación de los genotipos de CYP450 2D6 y 2C19 y del fenotipo predicho.**

El análisis de datos se realiza en varios pasos mediante el software operativo GeneChip y el programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 v2.0 o el programa Molecular Diagnostic Software (AMDS v1.0) de Affymetrix y el programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 v3.0: En primer lugar el software AMDS sitúa automáticamente una rejilla sobre la imagen leída del microarray con el fin de demarcar las celdas de sondas individuales y calcular la intensidad media correspondiente a cada una de ellas; a continuación, el programa para el análisis de datos

para AmpliChip CYP450 utiliza algoritmos específicos CYP450 para analizar los patrones de intensidad y determinar el genotipo en cada uno de los sitios polimórficos especificados mediante el análisis del alcance relativo de la hibridación con sondas complementarias de secuencias mutantes y nativas incluidas en el microarray de sondas y en tercer lugar el algoritmo del programa para el análisis de datos para AmpliChip CYP450 compila la información genotípica correspondiente a cada uno de los 29 polimorfismos y la compara con las combinaciones de patrones genotípicos de alelos conocidos con el fin de identificar los correspondientes alelos en el ADN de la prueba. Si los polimorfismos corresponden a un alelo definido del gen respectivo, se denota al alelo con la nomenclatura estándar. Se genera un informe que resume la genotipificación e indica los correspondientes alelos identificados. La información genotípica se utiliza para predecir la actividad enzimática CYP2D6 y CYP2C19 del individuo conforme a las conclusiones de estudios publicados.

## IV.2. CÁLCULO DE RESULTADOS.

El software para el análisis de datos para la prueba AmpliChip CYP450 analiza los patrones de intensidad de cada celda de sondas y determina el genotipo en cada uno de los sitios polimórficos especificados. Con esa información, se elabora un resumen de las combinaciones de genotipos obtenidos en los sitios polimórficos y se identifican los correspondientes alelos de CYP2D6 y CYP2C19.

### IV.2.1. Interpretación de los resultados.

La serie es válida si se obtienen los resultados siguientes para los controles:

Control	Resultado para CYP2D6	Resultado para CYP2C19
A-CHIP (-) C	Ninguna llamada	Ninguna llamada
CYP450 (+) C	*4/*41	*1/*2

Si la serie no es válida, es necesario repetirla por completo (amplificación, fragmentación, rotulado, hibridación y lectura óptica).

Los resultados obtenidos para las muestras se interpretan en función de las variantes alélicas investigadas con la prueba AmpliChip CYP450 de la siguiente forma:

#### IV.2.1.1. Alelos de CYP2D6 investigados con la prueba AmpliChip CYP450.

La combinación de polimorfismos permite predecir la actividad enzimática probable del producto génico alélico para CYP2D6 (Tabla 10). El alelo viene definido por las modificaciones nucleotídicas indicadas en negrita que son las más representativas y que por consenso científico se han escogido para definir al alelo. Las otras mutaciones se han incluido también por consenso dentro del mismo alelo, ya que producen el mismo efecto de actividad o presentan una configuración tridimensional del enzima similar.

**Tabla 10.** Alelos de CYP2D6 estudiados.

<b>Alelo</b>	<b>Modificación nucleotídica</b>	<b>Actividad enzimática predicha</b>	<b>Referencia</b>
*1	Ninguna	Normal	Marez et al, 1997 Sachse et al, 1997 Kimura et al, 1989
*2ABD	<b>-1584G</b> , 1039C>T, 1661G>C, <b>2850C&gt;T</b> , <b>4180G&gt;C</b>	Normal	Johansson et al, 1993 Panserat et al, 1994 Raimundo et al, 2000 Marez et al, 1997
*3	<b>2549A</b> del	Ninguna	Kagimoto et al, 1990 Marez et al, 1997
*4ABDJ K	100C>T, 1039C>T, 1661G>C, <b>1846G&gt;A</b> , 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Sachse et al, 1997 Marez et al, 1997 Kagimoto et al, 1990
<b>Alelo</b>	<b>Modificación nucleotídica</b>	<b>Actividad enzimática predicha</b>	<b>Referencia</b>
*5	<b>Delección del gen CYP2D6 completo</b>	Ninguna	Gaedigk et al, 1991 Steen et al, 1995
*6ABC	<b>1707T</b> del, 1976G>A, 4180G>C	Ninguna	Marez et al, 1997 Evert et al, 1994 Daly et al, 1995 Saxena et al, 1994
*7	<b>2935A&gt;C</b>	Ninguna	Evert et al, 1994

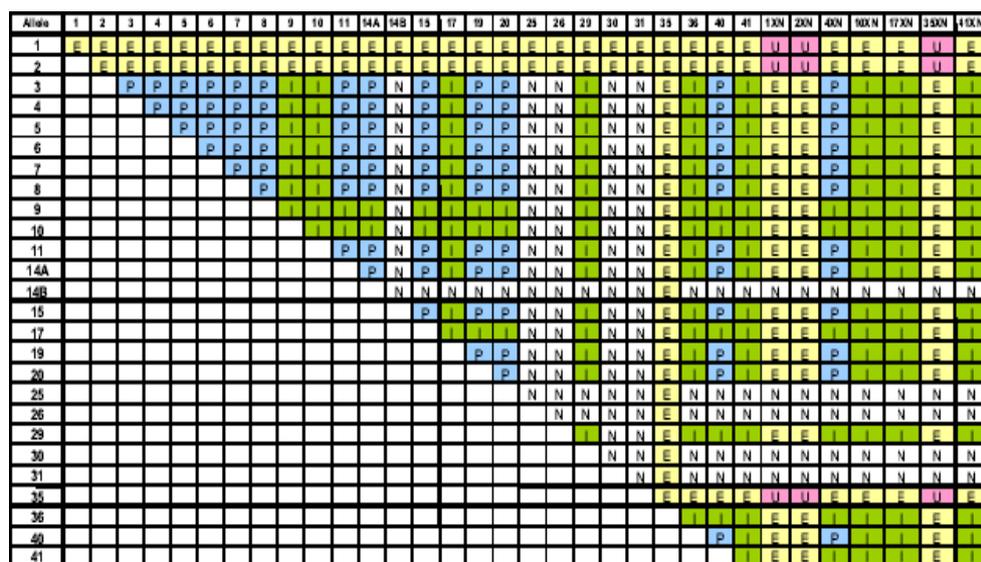
IV. Resultados.

*8	1661G>C, <b>1758G&gt;T</b> , 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Broly et al, 1995
*9	<b>2613-2615delAGA</b>	Reducida	Tyndale et al, 1991 Broly & Meyer, 1993
*10AB	<b>100C&gt;T</b> , 1039C>T, 1661G>C, 4180G>C	Reducida	Yokota et al, 1993 Johansson et al, 1994
*11	<b>883G&gt;C</b> , 1661G>C, 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Marez et al, 1995
*14A	C100T, <b>G1758A</b> , C2850T, G4180C	Ninguna	Wang, 1992 Wang et al, 1999
*14B	G1661C, <b>G1758A</b> , C2850T, G4180C	Desconocida	Ji et al, 2002
*15	<b>138 ins T</b>	Ninguna	Sachse et al, 1996
*17	<b>1023C&gt;T</b> , 1661G>C, <b>2850C&gt;T</b> , 4180G>C	Reducida	Masimirembwa et al, 1999.
*19	1661G>C, <b>2539- 2542delAACT</b> , 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Marez et al, 1997
*20	1661G>C, <b>1973insG</b> , 1978C>T, 1979T>C, 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Marez-Allorge et al, 1999
*25	<b>C3198G</b>	Desconocida	Marez et al, 1997
*26	<b>T3277C</b>	Desconocida	Marez et al, 1997
*29	<b>1659G&gt;A</b> , 1661G>C, 2850C>T, <b>3183G&gt;A</b> , 4180G>C	Reducida	Marez et al, 1997
*30	G1661C, <b>repetición 1855- 1863 ins(TTTCGCCCC)</b> , C2850T, G4180C	Desconocida	Marez et al, 1997
*31	G1661C, C2850T, <b>G4042A</b> , G4180C	Desconocida	Marez et al, 1997

<b>Alelo</b>	<b>Modificación nucleotídica</b>	<b>Actividad enzimática predicha</b>	<b>Referencia</b>
*35	1584C, <b>G31A</b> , G1661C, C2850T, G4180C	Normal	Marez et al, 1997
*36	C100T, C1039T, G1661C, <b>conversion génica a CYP2D7 en el exón 9</b>	Reducida	Mitsunaga et al, 2002 Ishiguro et al, 2004
*40	<b>1023C&gt;T</b> , 1661G>C, <b>1863ins(TTT CGC CCC)2</b> ; 2850C>T, 4180G>C	Ninguna	Gaedigk et al, 2002
*41	<b>-1584C</b> , 1661G>C, <b>2850C&gt;T</b> , <b>4180G&gt;C</b>	Reducida	Raimundo et al, 2000 Raimundo et al, 2004
*1XN	genes *1 activos duplicados (n sin determinar; rango 2-13)	Aumentada	Dahl et al, 1995 Sachse et al, 1997
*2XN	genes *2 activos duplicados (n sin determinar; rango 2-13)	Aumentada	Johansson et al, 1993 Dahl et al, 1995
*4XN	Genes *4 inactivos duplicados (n sin determinar)	Ninguna	Lovlie et al, 1997 Sachse et al, 1998
*10XN	genes *10 parcialmente activos duplicados (n sin determinar)	Reducida	Garcia-Barceló et al, 2000 Ji et al, 2002 Mitsunaga et al, 2002 Ishiguro et al, 2004
*17XN	genes *17 parcialmente activos duplicados (n sin determinar)	Reducida	Cai et al, 2006 Gaedigk et al, 2007
*35XN	genes *35 activos duplicados (n sin determinar)	Aumentada	Griese et al, 1998
*41XN	genes *41 parcialmente activos duplicados (n sin determinar)	Reducida	Candiotti et al, 2005

**IV.2.1.2. Actividad metabólica CYP450 2D6 predicha.**

La combinación de la actividad de las enzimas codificadas por los dos alelos de CYP2D6 determina la actividad metabólica global del individuo (Figura 23). Hay cuatro tipos fenotípicos: metabolizadores deficientes, metabolizadores intermedios, metabolizadores eficientes y metabolizadores ultrarrápidos. (Tabla 11).



**Figura 23.** Fenotipos asociados con las variantes alelicas de CYP2D6.

**Tabla 11.** Fenotipos para CYP2D6.

<b>E</b>	Extensivo (Eficiente)
<b>I</b>	Intermedio
<b>P</b>	Pobre (Lento)
<b>U</b>	Ultrarrápido
<b>N</b>	Desconocido

#### IV.2.1.3. Alelos de CYP2C19 investigados con la prueba AmpliChip CYP450.

La presencia o ausencia de los polimorfismos particulares indicados en la tabla 12 determina el alelo CYP2C19 y predice la actividad enzimática probable del producto génico. El alelo viene definido por las modificaciones nucleotídicas indicadas en negrita.

**Tabla 12.** Alelos de CYP2C19 estudiados.

Alelo	Modificación nucleotídica	Actividad enzimática predicha	Referencia
*1	Ninguna	Normal	Romkes et al, 1991 Richardson et al, 1995 Blaisdell et al, 2002
*2	<b>681G&gt;A</b>	Ninguna	de Morais et al, 1994 Ibeanu et al, 1998
*3	<b>636G&gt;A</b>	Ninguna	de Morais et al, 1994

#### IV.2.1.4. Actividad metabólica CYP450 2C19 predicha.

La combinación de la actividad de las enzimas codificadas por los dos alelos de CYP2C19 determina la actividad metabólica global del individuo (Tabla 13). Hay dos tipos fenotípicos: metabolizadores deficientes y metabolizadores eficientes (Tabla 14).

**Tabla 13.** Combinación para los alelos de CYP2C19.

Alelo	1	2	3
1	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
2		<b>P</b>	<b>P</b>
3			<b>P</b>

**Tabla 14.** Fenotipos para CYP2C19.

<b>E</b>	Extensivo (Eficiente)
<b>P</b>	Pobre (Deficiente)

**IV.2.1.5. Alelos no detectados en nuestro estudio.**

Existen algunos alelos de los genes CYP2D6 y CYP2C19 que no son detectados por la prueba AmpliChip CYP450 (Tabla 15). En caso de alelos raros que la prueba AmpliChip CYP450 no pueda detectar, el software para el análisis de datos para AmpliChip asignará de forma predeterminada el alelo más similar genéticamente. Por ejemplo, la prueba AmpliChip CYP450 no está diseñada actualmente para detectar el alelo que define el SNP 2573insC presente en el alelo de CYP2D6\*21B (formado por un haplotipo de CYP2D6\*2). Para las muestras que contienen este alelo raro, el software para el análisis de datos AmpliChip notificaría el alelo CYP2D6\*2 que está estrechamente relacionado.

**Tabla 15.** Alelos no detectados por la prueba AmpliChip CYP450.

<b>Gen CYP450</b>	<b>Alelos no detectados por la prueba AmpliChip CYP450</b>
CYP2C19	4-19
CYP2D6	12, 13, 16, 18, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 42-59, 61-67

### IV.3. RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO ESTUDIO.

#### IV.3.1. Resultados en el genotipado.

Hemos analizado 90 muestras y realizado el genotipado de los genes CYP2D6 y CYP2C19 con los resultados que se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados del genotipado para CYP2D6 y CYP2C19.

Número	Fenotipo	CYP2D6	CYP2C19
TX01	Eficiente	*1/*1	*1/*1
TX02	Eficiente	*1/*1	*1/*1
TX03	Ultra-rápido	*1/*1XN	*1/*1
TX04	Eficiente	*1/*35	*1/*1
TX05	Eficiente	*1/*2	*1/*1
TX06	Eficiente	*1/*10	*1/*1
TX07	Eficiente	*1/*2	*1/*2
TX08	Eficiente	*1/*4	*1/*1
TX09	Eficiente	*1/*35	*1/*2
TX10	Intermedio	*9/*41	*1/*1
TX11	Eficiente	*1/*2	*1/*2
TX12	Eficiente	*2/*4	*1/*2
TX13	Eficiente	*2/*2	*1/*2
TX14	Eficiente	*2/*5	*1/*1
TX15	Eficiente	*1/*9	*1/*1
TX16	Intermedio	*4/*41	*1/*1
TX17	Eficiente	*1/*35	*1/*1
TX18	Lento	*4/*4	*1/*1
TX19	Eficiente	*2/*4	*1/*1
TX21	Eficiente	*1/*2	*1/*1
TX22	Eficiente	*2/*4	*1/*1
TX23	Eficiente	*1/*35	*1/*1
TX24	Eficiente	*1/*41	*1/*2
TX25	Eficiente	*1/*2	*1/*2
TX26	Eficiente	*1/*4	*1/*1
TX27	Intermedio	*9/*9	*1/*1
TX28	Eficiente	*1/*1	*1/*1
TX29	Eficiente	*1/*1	*1/*2
TX30	Eficiente	*2/*2	*1/*1
TX31	Eficiente	*1/*1	*1/*1
TX32	Eficiente	*1/*35	*1/*1
TX33	Eficiente	*1/*41	*1/*1
TX34	Eficiente	*2/*4	*1/*1
TX35	Eficiente	*1/*2	*1/*1

Número	Fenotipo	CYP2D6	CYP2C19
TX36	Eficiente	*1/*2	*1/*1
TX37	Eficiente	*1/*4	*1/*2
TX38	Eficiente	*2/*2	*1/*1
TX39	Eficiente	*2/*2	*1/*1
TX40	Lento	*4/*4	*1/*1
TX41	Eficiente	*1/*41	*1/*1
TX42	Eficiente	*1/*4	*1/*1
TX44	Intermedio	*4/*17	*1/*2
TX45	Intermedio	*9/*41	*1/*2
TX46	Eficiente	*2/*41	*1/*1
TX47	Eficiente	*1/*9	*1/*1
TX48	Eficiente	*1/*4	*1/*1
TX49	Eficiente	*1/*35	*1/*1
TX50	Eficiente	*2/*4	*1/*1
TX51	Eficiente	*1/*10	*1/*1
TX52	Intermedio	*4/*10	*1/*2
TX53	Eficiente	*2/*35	*1/*1
TX54	Eficiente	*2/*4	*2/*2
TX56	Eficiente	*2/*9	*1/*1
TX57	Eficiente	*4/*35	*1/*1
TX58	Lento	*4/*4	*1/*1
TX59	Eficiente	*1/*1	*1/*1
TX60	Eficiente	*1/*2	*1/*2
TX61	Ultra-rápido	*1XN/*2	*1/*1
TX62	Intermedio	*4/*10	*1/*1
TX63	Eficiente	*2/*10	*1/*1
Tx64	Intermedio	*4/*41	*1/*2
Tx65	Lento	*4/*4	*1/*2
Tx66	Eficiente	*1/*2	*1/*2
Tx67	Eficiente	*1/*1	*1/*1
Tx68	Eficiente	*4/*35	*1/*1
Tx69	Eficiente	*1/*2	*1/*1
Tx70	Eficiente	*2/*2	*1/*2
Tx71	Eficiente	*1/*4	*1/*1
Tx73	Eficiente	*1/*1	*1/*1
Tx74	Eficiente	*1/*9	*1/*2
Tx75	Eficiente	*2/*2	*1/*1
Tx76	Eficiente	*1/*2	*1/*2
Tx77	Eficiente	*1/*1	*1/*1
Tx78	Eficiente	*1/*2	*1/*1
Tx79	Eficiente	*1/*1	*1/*1
Tx80	Eficiente	*2/*10	*1/*1
Tx81	Eficiente	*2XN/*4	*1/*1
Tx82	Eficiente	*1/*1	*1/*2
Tx83	Eficiente	*1/*4	*1/*1
Número	Fenotipo	CYP2D6	CYP2C19

Tx84	Eficiente	*4/*35	*1/*1
Tx85	Eficiente	*4/*35	*1/*1
Tx86	Intermedio	*4/*9	*1/*1
Tx87	Eficiente	*10/*35	*1/*2
Tx88	Intermedio	*17/*41	*1/*1
Tx89	Intermedio	*41/*41	*1/*2
Tx90	Eficiente	*1/*1	*1/*1
Tx91	Lento	*4/*4	*1/*2
Tx92	Eficiente	*1/*2	*1/*1
Tx93	Eficiente	*1/*1	*1/*2
Tx95	Eficiente	*1/*1	*2/*2

#### IV.3.1.1. Resultados para el gen CYP2D6.

De las 90 pacientes estudiadas 72 corresponden a un fenotipo eficiente o extensivo, 11 son intermedias, 2 ultrarrápidas y 5 son metabolizadoras lentas o pobres que representan un 80%, 12.2%, 2.2% y 5.6% respectivamente del total de las 90 estudiadas.

Para el gen CYP2D6 se han encontrado 28 genotipos diferentes y 11 alelos distintos. El número y porcentaje de genotipos y de alelos encontrados en las 90 muestras analizadas aparece reflejado en las tablas 16 y 17.

**Tabla 16.** Número y porcentaje de genotipos encontrados.

Genotipo	Número	Porcentaje (%)
*1/*1	14	15.6
*1/*2	13	14.5
*1/*4	7	7.8
*1/*35	6	6.7
*2/*2	6	6.7
*2/*4	6	6.7
*4/*4	5	5.6
*4/*35	4	4.5
*1/*9	3	3.3
*1/*41	3	3.3
*2/*10	2	2.2
*1/*10	2	2.2

IV. Resultados.

*4/*10	2	2.2
*9/*41	2	2.2
*4/*41	2	2.2
*2/*5	1	1.1
*2XN/*4	1	1.1
*10/*35	1	1.1
*2/*41	1	1.1
*9/*9	1	1.1
*4/*17	1	1.1
*4/*9	1	1.1
*17/*41	1	1.1
*41/*41	1	1.1
*1/*1XN	1	1.1
*2/*35	1	1.1
*2/*9	1	1.1
*1XN/*2	1	1.1
<b>TOTAL: 28</b>	<b>TOTAL: 90</b>	<b>TOTAL: 100</b>

**Tabla 17.** Número y porcentaje de alelos de las 90 muestras analizadas.

<b>Alelos</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
*1	63	35.0
*2	38	21.0
*4	34	18.9
*35	12	6.7
*41	11	6.1
*9	9	5.0
*10	7	3.9
*1XN	2	1.1
*17	2	1.1
*5	1	0.6
*2XN	1	0.6
<b>TOTAL: 11</b>	<b>TOTAL: 180</b>	<b>TOTAL: 100</b>

**IV.3.1.1.1. Metabolizadoras eficientes para CYP2D6.**

De las 90 pacientes estudiadas 72 han sido metabolizadoras eficientes o extensivas para el gen CYP2D6 con 17 genotipos y 9 alelos diferentes. El número y porcentaje de genotipos y de alelos encontrados en las metabolizadoras eficientes aparece reflejado en las tablas 18 y 19.

**Tabla 18.** Número y porcentaje de genotipos de las metabolizadoras eficientes.

<b>Genotipo</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
*1/*1	14	19.44
*1/*2	13	18.06
*1/*4	7	9.72
*1/*35	6	8.33
*2/*2	6	8.33
*2/*4	6	8.33
*4/*35	4	5.57
*1/*9	3	4.17
*1/*41	3	4.17
*2/*10	2	2.77
*1/*10	2	2.77
*2/*5	1	1.39
*2/*41	1	1.39
*2XN/*4	1	1.39
*2/*9	1	1.39
*2/*35	1	1.39
*10/*35	1	1.39
<b>TOTAL: 17</b>	<b>TOTAL: 72</b>	<b>TOTAL: 100</b>

**Tabla 19.** Número y porcentaje de alelos de metabolizadoras eficientes.

<b>Alelos</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
*1	62	43.06
*2	37	25.69
*4	18	12.50
*35	12	8.33
*10	5	3.48
*41	4	2.78
*9	4	2.78
*5	1	0.69
*2XN	1	0.69
<b>TOTAL: 9</b>	<b>TOTAL: 144</b>	<b>TOTAL: 100</b>

#### IV.3.1.1.2. Metabolizadoras intermedias para CYP2D6.

De las 90 pacientes estudiadas 11 han sido metabolizadoras intermedias para el gen CYP2D6 con 8 genotipos y 5 alelos diferentes. El numero y porcentaje de genotipos y de alelos encontrados en las metabolizadoras intermedias aparece reflejado en las tablas 20 y 21.

**Tabla 20.** Número y porcentaje de genotipos de las metabolizadoras intermedias.

Genotipo	Número	Porcentaje (%)
*9/*41	3	27.2
*4/*10	2	18.2
*9/*9	1	9.1
*4/*17	1	9.1
*4/*41	1	9.1
*4/*9	1	9.1
*17/*41	1	9.1
*41/*41	1	9.1
<b>TOTAL: 8</b>	<b>TOTAL: 11</b>	<b>TOTAL: 100</b>

**Tabla 21.** Número y porcentaje de alelos de metabolizadoras intermedias.

Alelos	Número	Porcentaje (%)
*41	7	31.80
*9	6	27.27
*4	5	22.73
*17	2	9.1
*10	2	9.1
<b>TOTAL: 5</b>	<b>TOTAL: 22</b>	<b>TOTAL: 100</b>

#### IV.3.1.1.3. Metabolizadoras pobres para CYP2D6.

De las 90 pacientes estudiadas 5 han sido metabolizadoras pobres (lentas) para el gen CYP2D6 correspondientes en todos los casos al genotipo \*4/\*4.

#### IV.3.1.1.4. Metabolizadoras ultrarrápidas para CYP2D6.

De las 90 pacientes estudiadas 2 han sido metabolizadoras ultrarrápidas para el gen CYP2D6 con 2 genotipos diferentes y 3 alelos distintos. El número y porcentaje de genotipos y de alelos encontrados en las metabolizadoras ultrarrápidas aparece reflejado en las tablas 22 y 23.

**Tabla 22.** Número y porcentaje de genotipos de las metabolizadoras ultrarrápidas.

Genotipo	Número	Porcentaje (%)
*1/*1XN	1	50
*1XN/*2	1	50
<b>TOTAL: 2</b>	<b>TOTAL: 2</b>	<b>TOTAL: 100</b>

**Tabla 23.** Número y porcentaje de alelos de metabolizadoras ultrarrápidas.

Alelos	Número	Porcentaje (%)
*1XN	2	50
*2	1	25
*1	1	25
<b>TOTAL: 3</b>	<b>TOTAL: 4</b>	<b>TOTAL: 100</b>

#### IV.3.1.2. Resultados para el gen CYP2C19.

Los resultados obtenidos para el gen CYP2C19 (tabla 24) reflejan que en nuestras pacientes se han encontrado tres genotipos diferentes siendo el \*1/\*1 el mayoritario. En este gen hemos encontrado 2 alelos distintos. (Tabla 25).

**Tabla 24.** Número y porcentaje de genotipos para CYP2C19.

Genotipo	Número	Porcentaje (%)
*1/*1	64	71.1
*1/*2	24	26.7
*2/*2	2	2.2
<b>TOTAL</b>	90	100

**Tabla 25.** Número y porcentaje de alelos para CYP2C19.

Alelos	Número	Porcentaje (%)
*1	152	84.4
*2	28	15.6
<b>TOTAL</b>	180	100

#### IV.3.2. Concentraciones de Tamoxifeno y sus metabolitos.

Se han determinado las concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus principales metabolitos: 4-OH-tamoxifeno, endoxifeno, N-desmetiltamoxifeno y N-oxidotamoxifeno en las pacientes que tras el genotipado han resultado metabolizadoras lentas y metabolizadoras intermedias para el gen CYP2D6. De la misma forma se han medido dichas concentraciones en un grupo control formado por aquellas primeras 20 pacientes que de forma consecutiva hayan sido rastreadas para el genotipo de CYP2D6 y se haya encontrado un genotipo que se corresponda con un estado metabolizador normal (extensivas o ultrarrápidas). En los casos de las metabolizadoras lentas los niveles se determinaron tras la administración de 20, 40 y 60 mg de Tamoxifeno en intervalos de cuatro meses cada dosis, es decir, a los 4, 8 y 12 meses desde la entrada de la paciente en el estudio. Para las pacientes del grupo control y las metabolizadoras intermedias únicamente se determinaron los niveles de Tamoxifeno y sus metabolitos tras la administración de 20 mg de Tamoxifeno (a los cuatro meses de su entrada en el estudio). Estas determinaciones se llevaron a cabo en la Fundación Tejerina de Madrid empleando instrumentación HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 25, 26 y 27.

**Tabla 26.** Concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus principales metabolitos en pacientes del grupo control.

<b>Muestra</b>	<b>4OH-Tamoxifeno (ng/mL)</b>	<b>Endoxifeno (ng/mL)</b>	<b>N-desmetil-tamoxifeno (ng/mL)</b>	<b>Tamoxifeno (ng/mL)</b>	<b>N- oxido tamoxifeno (ng/mL)</b>
Tx 1	5,69	19,32	250,43	109,59	15,69
Tx 2	7,72	21,07	331,39	184,78	45,33
Tx 4	<1,05	4,03	316,29	106,63	38,42
Tx 5	<1,05	5,13	446,06	148,17	40,1
Tx 6	8,2	15,16	388,71	122,42	26,15
Tx 7	3,09	17,01	269,07	149,88	41,84
Tx 8	3,55	11,94	429,19	187,36	24,4
Tx 9	2,42	4,57	335,46	103,47	15,69
Tx 11	1,9	5,38	564,71	198,81	76,71
Tx 12	3,31	14,16	332,71	107,72	41,84
Tx 13	2,75	14,01	564,56	205,15	48,81
Tx 14	2,14	12,34	317,87	150,75	45,33
Tx 15	5,94	11,8	398,77	125,43	38,35
Tx 17	8,34	12,13	485,02	153,7	33,12
Tx19	5,12	5,4	603,01	235,19	106,35
Tx 21	2,88	5,01	454,91	169,55	59,27
Tx 22	6,4	6,74	497,51	166,2	45,33
Tx 23	6,05	13,74	464,98	201,08	55,79
Tx 24	4,76	9,02	666,39	222,45	64,5
Tx 25	5,76	9,37	554	241,34	64,26

**Tabla 27.** Concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus principales metabolitos en pacientes "metabolizadoras intermedias" para CYP2D6 tras la administración de 20 mg de Tamoxifeno.

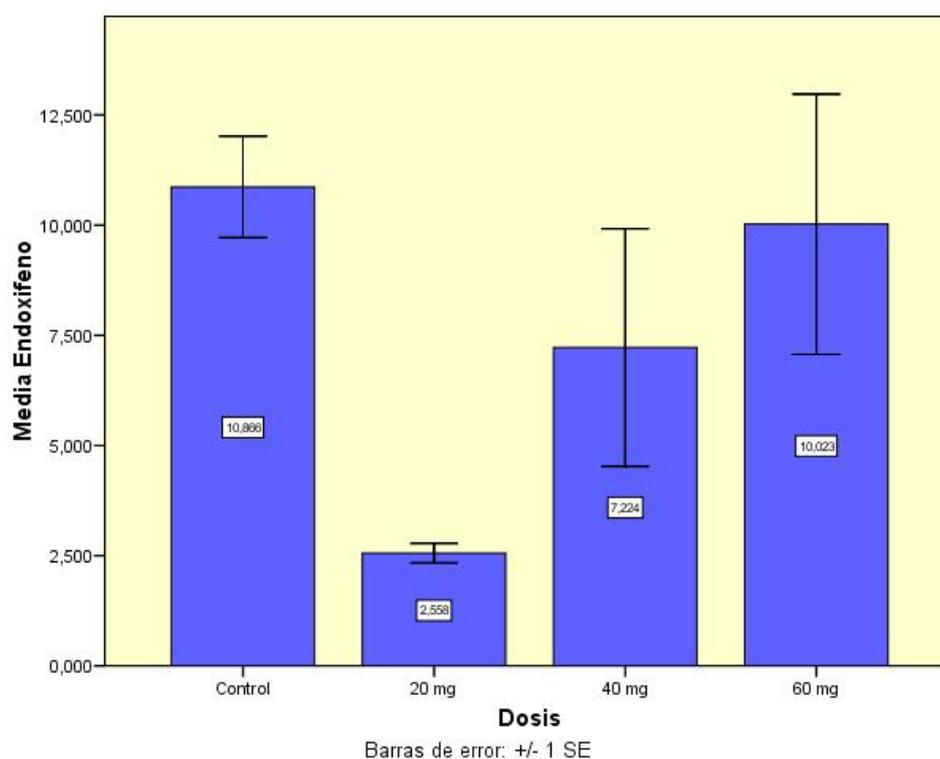
Muestra	4OH-Tamoxifeno (ng/mL)	Endoxifeno (ng/mL)	N-desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	N-oxido-tamoxifeno (ng/mL)
Tx 10	<1,05	7,59	271,13	136,99	66,25
Tx 16	5,08	9,53	364,81	130,54	27,89
Tx 27	7,19	18,03	847,98	289,96	45,33
Tx 44	4,87	9,78	589,1	198,95	40,1
Tx 45	<1,05	4,46	319,28	88,08	24,4
Tx 62	8,19	10	577,83	204,58	76,71
Tx 64	6,54	21,02	538,9	198,87	50,56
Tx 86	<1,05	<2,5	294,15	101,29	20,53

**Tabla 28.** Concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus principales metabolitos en pacientes "metabolizadoras lentas" para CYP2D6 tras la administración de 20 (1), 40 (2) y 60 (3) mg de Tamoxifeno.

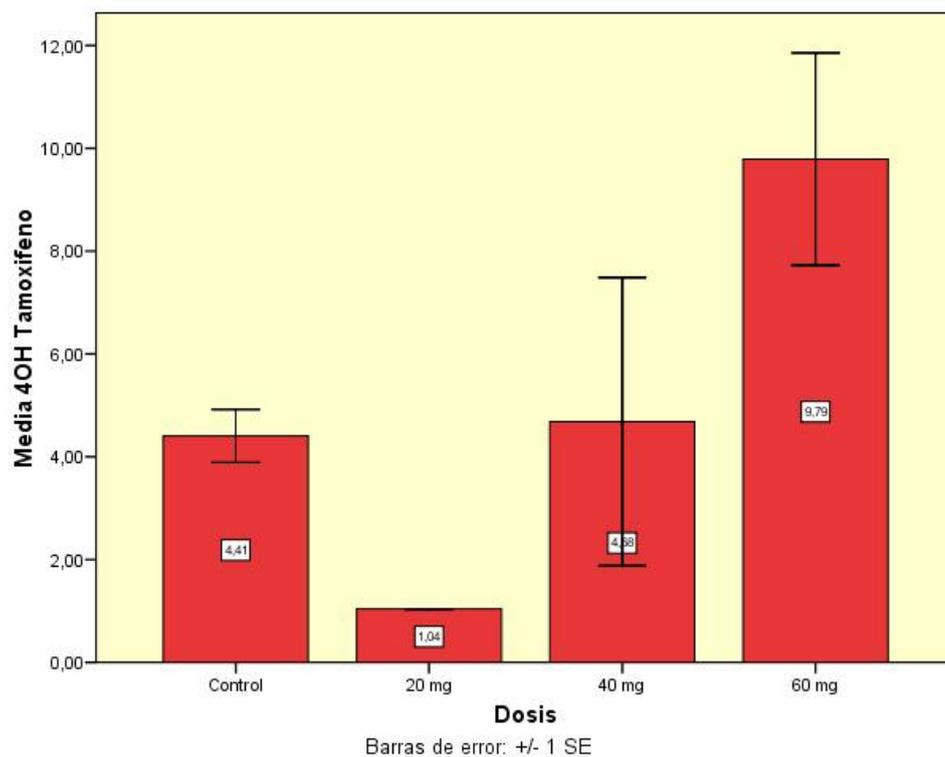
Muestras	4OH-Tamoxifeno (ng/mL)	Endoxifeno (ng/mL)	N-desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	N-oxido-tamoxifeno (ng/mL)
Tx 18	<1.05	<2.5	338.85	108.2	69.64
Tx 18(2)	<1.05	<2.5	458.94	137.09	93.36
Tx 40	<1.05	<2.5	806.77	265.56	51.36
Tx 40(2)	2.13	6.23	2107.16	551	99.50
Tx 40(3)	5.88	8.42	2500.34	288.35	13.42
Tx 58	<1.05	<2.5	327.29	109.90	59.48
Tx 58(2)	3.49	8.01	1353.59	356.88	156.27
Tx 58(3)	10.59	15.75	1973.45	323.21	22.97
Tx 65	<1.05	<2.5	288.22	92.27	36.58
Tx 65(2)	<1.05	<2.5	547.78	180.11	76.57
Tx 65(3)	12.9	5.9	936.33	234.12	11.48
Tx 91	<1.05	3.44	624.31	141.74	42.39
Tx 91(2)	15.74	17.08	845.22	346.03	52.31

### IV.3.3. Resultado de la comparación de las concentraciones de Tamoxifeno y sus metabolitos entre el grupo control (20mg) y las pacientes metabolizadoras lentas con 20, 40 y 60 mg.

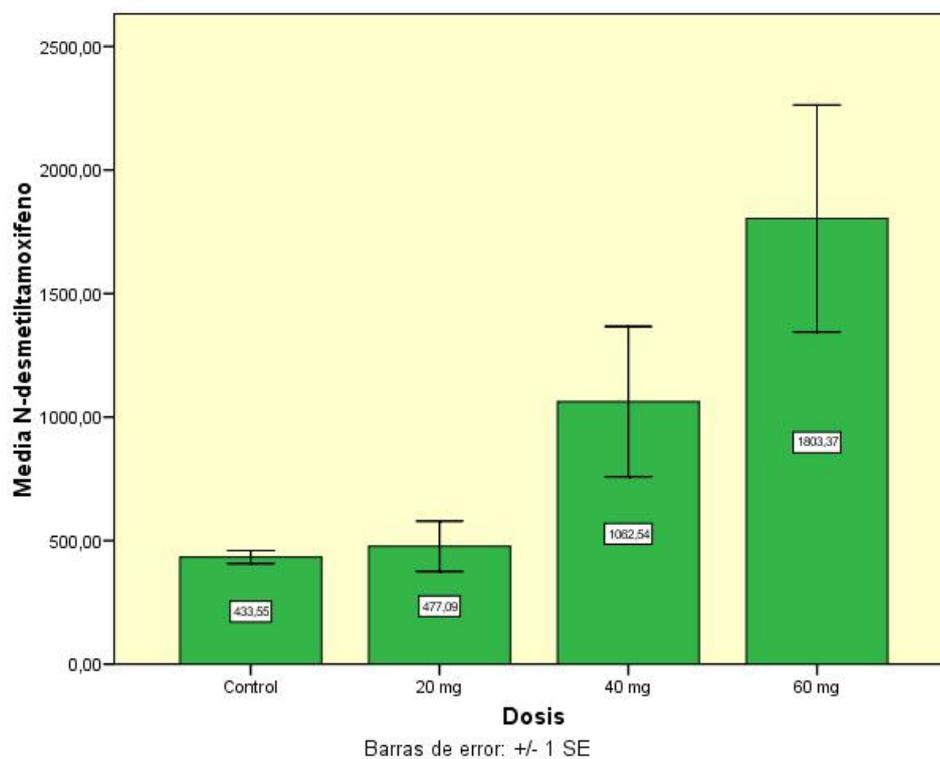
Los resultados obtenidos al comparar las concentraciones de Tamoxifeno y sus metabolitos (Endoxifeno, 4-OH-Tamoxifeno, N-desmetil-Tamoxifeno y N-oxido-Tamoxifeno) entre las pacientes del grupo control (metabolizadoras extensivas para CYP2D6) con dosis de 20 mg al día y las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg al día administradas estas últimas en intervalos de cuatro meses aparecen reflejados en las figuras 24 a 28.



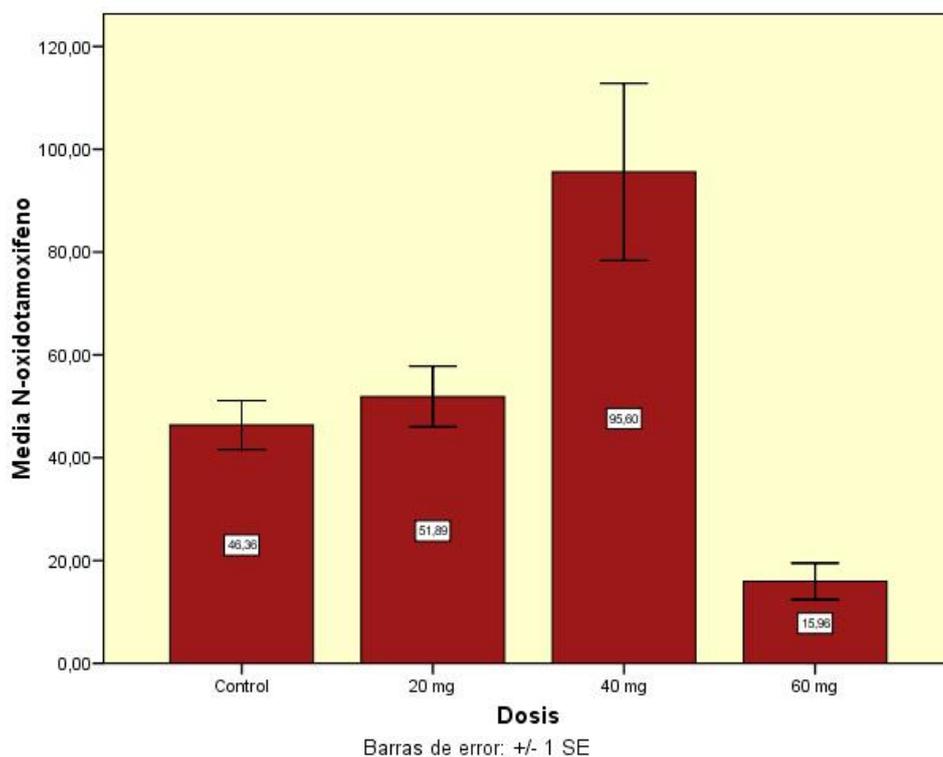
**Figura 24.** Niveles de Endoxifeno, (ng/ml) expresados como media +/- 1SE, en las pacientes del grupo control (metabolizadoras eficientes con dosis de 20 mg/día) y en las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg/día de Tamoxifeno. Control vs 20 mg  $p < 0.000$ .



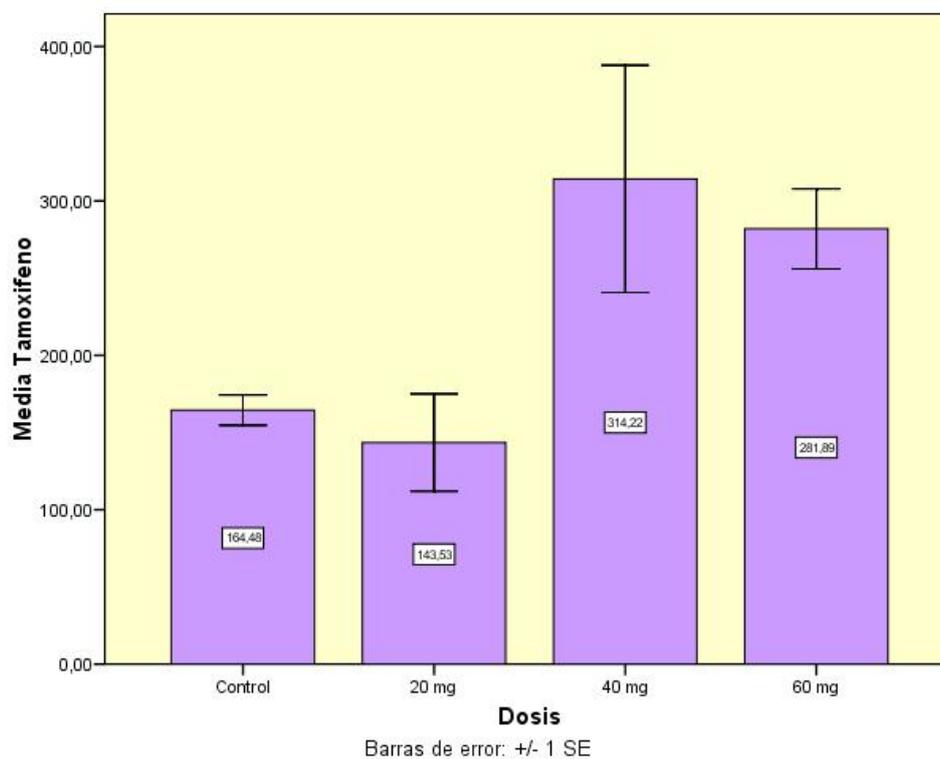
**Figura 25.** Niveles de 4-OH-Tamoxifeno, (ng/ml) expresados como media +/- 1SE, en las pacientes del grupo control (metabolizadoras eficientes con dosis de 20 mg/día) y en las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg/día de Tamoxifeno. Control vs 20 mg  $p < 0.000$ . Control vs 60 mg  $p < 0.002$ .



**Figura 26.** Niveles de N-desmetil-Tamoxifeno, (ng/ml) expresados como media +/- 1SE, en las pacientes del grupo control (metabolizadoras eficientes con dosis de 20 mg/día) y en las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg/día de Tamoxifeno. Control vs 60 mg  $p < 0.096$ .



**Figura 27.** Niveles de N-oxido-Tamoxifeno, (ng/ml) expresados como media +/- 1SE, en las pacientes del grupo control (metabolizadoras eficientes con dosis de 20 mg/día) y en las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg/día de Tamoxifeno. Control vs 40 mg  $p < 0.01$ . Control vs 60 mg  $p < 0.025$ .



**Figura 28.** Niveles de Tamoxifeno, (ng/ml) expresados como media +/- 1SE, en las pacientes del grupo control (metabolizadoras eficientes con dosis de 20 mg/día) y en las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 con dosis de 20, 40 y 60 mg/día de Tamoxifeno. Control vs 60 mg  $p < 0.000$ .



## **V. DISCUSSION**

---

## V. DISCUSION.

Los rápidos avances que se están consiguiendo en la comprensión de la vida a nivel molecular están cambiando la medicina en muchos aspectos.

En la actualidad es posible conocer las diferencias entre la secuencia de DNA de un gen normal y la secuencia de DNA alterada responsable de una enfermedad, lo que ha permitido diseñar pruebas que puedan detectar estas diferencias y así diagnosticar a nivel molecular la enfermedad.

Se admite hoy en día que la mayoría de las enfermedades tienen una causa molecular. Cualquier enfermedad cursa en mayor o menor medida con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de las biomoléculas; de ahí que un estudio moderno de la enfermedad requiera la consideración de los aspectos moleculares que acompañan a las observaciones clínicas. Las clasificaciones clínicas se basan en el diagnóstico a partir de la observación médica (exploración) con el apoyo de los datos del laboratorio. Las clasificaciones moleculares, o el estudio de la enfermedad bajo un enfoque molecular, se basan exclusivamente en criterios genotípicos. Los polimorfismos de un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) son las variaciones más frecuentes en la secuencia del DNA, ganando cada vez más importancia en las aplicaciones biológicas y biomédicas. Pueden afectar tanto a regiones codificantes del genoma como no codificantes. Los SNPs ocurren en un rango de 1.3 Kb en el genoma humano, y son fundamentalmente bi-alélicos (*Smigielski et al., 2000; Venter et al., 2001*).

La farmacogenética se encarga del estudio de la variabilidad individual en la respuesta a los fármacos, según las características genéticas de cada persona. Las terapias farmacogenéticas son tratamientos individualizados, que intentan minimizar la resistencia y la toxicidad de los fármacos a la vez que maximizan la respuesta de los pacientes.

La secuenciación completa del genoma humano ha acelerado en los últimos años la identificación de variantes en las secuencias de ADN, comúnmente llamadas polimorfismos. Un polimorfismo se define como un locus, donde dos o más alelos están presentes en la población con una frecuencia mayor del 1%. Variaciones a nivel de ADN son las responsables de la diferente respuesta que presentan distintos pacientes ante un

mismo fármaco, lo cual plantea la alternativa de poder a cabo un estudio genético previo a la selección del tratamiento más eficaz.

Los polimorfismos denominados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) son los que presentan una mayor variación en el genoma humano. Aproximadamente el 90% de la variabilidad genética humana es atribuible a los SNPs, mientras que el resto se debe fundamentalmente a inserciones, deleciones, repeticiones en tándem y microsatelites. Los SNPs son muy numerosos, estables y están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Estos polimorfismos se consideran de gran interés ya que generan diferencias en la estructura de la proteína, provocando el desarrollo de enfermedades y la aparición de fenotipos diferentes. (*Zhao y Boerwinkle., 2002*).

Además los SNPs han contribuido satisfactoriamente en la identificación y caracterización de mutaciones implicadas en la determinación de determinados trastornos genéticos así como en la identificación de individuos portadores de las mismas. (*Risch y Merikangas., 1996*).

Hoy en día existen tecnologías sofisticadas basadas en microchips que permiten un diagnóstico *in vitro* que proporciona un genotipado individual de alta fiabilidad. Actualmente han sido identificados más de cinco millones de SNPs por parte de consorcios públicos y privados. El interés por la investigación en este campo parece lógico, ya que se ha demostrado que ciertos polimorfismos pueden informar al investigador de forma directa o indirecta acerca de cómo predecir tanto la respuesta como la toxicidad de los agentes quimioterápicos.

Mediante la potencial identificación de pacientes con riesgo de toxicidad severa o de aquellos que se beneficiarán de la terapia, los clínicos serán capaces de individualizar los tratamientos para el cáncer. Sin olvidarnos de la influencia de factores no genéticos, se ha estimado que la herencia genética podría explicar del 20% al 95% de la variabilidad individual en la respuesta a un fármaco. (*Raña et al., 2006*).

Dentro de los diferentes tratamientos aplicados hoy en día a los casos de cáncer de mama, el uso de antiestrógenos (Tamoxifeno) e inhibidores de la aromatasa (anastrozol, exemestán, letrazol) están indicados para los tumores localizados y que son positivos para los receptores de estrógenos. (*Carpenter y Miller., 2005*). Esta variedad de tratamientos plantea la necesidad de llevar a cabo un estudio del paciente previo a la selección del tratamiento, en el cual la farmacogenética se revela como una alternativa de enorme interés. (*Marsh y McLeod., 2007*). En nuestro caso nos hemos centrado en el fármaco Tamoxifeno ya que es uno de los más extensamente utilizados en el tratamiento

del cáncer de mama y ha sido ampliamente demostrado como las diferencias genéticas interindividuales provocan una eficacia del tratamiento y un beneficio para la mujer que puede variar de unas pacientes a otras.

El Tamoxifeno se transforma en el organismo en una serie de metabolitos con mayor actividad antiestrogenica como el caso del endoxifeno a través del sistema enzimático CYP450 en el que juega un papel esencial la enzima CYP2D6. (Ver Introducción).

Los polimorfismos del citocromo P450, son frecuentes en la población general. Hasta la fecha se han identificado aproximadamente un centenar de polimorfismos en el gen CYP2D6 dando lugar a diferencias en su capacidad metabólica. Un SNP funcional en el CYP2D6 u otro enzima CYP, podría influir en la concentración relativa de cada metabolito del Tamoxifeno. Mujeres con polimorfismos en el CYP2D6, tuvieron concentraciones significativamente menores del metabolito endoxifeno, en comparación con las mujeres que tenían el genotipo normal "*wild-type*" (WT). (Goss *et al.*, 2003). Es por esta razón que uno de los genes más extensamente estudiados en cuanto a su relación con el metabolismo del Tamoxifeno es CYP2D6. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 22 y codifica para la enzima P450, familia 2, subfamilia D, polipeptido 6. Su función principal en el organismo es la hidroxilación de aproximadamente un 25% de los fármacos generando compuestos más solubles en agua y más fáciles de excretar. En el caso del Tamoxifeno participa en la conversión de TAM en 4-hidroxi-TAM y de N-dimetil-TAM en 4-hidroxi-N-dimetil-TAM o endoxifeno. (Desta *et al.*, 2004).

En la actualidad han sido identificados más de 100 polimorfismos en el CYP2D6 (Fernández-Santander *et al.*, 2010.), (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>) que dan lugar a cuatro tipos fenotípicos: metabolizadores deficientes con inactivación génica de ambos alelos, metabolizadores intermedios con un alelo de actividad reducida y un alelo nulo, metabolizadores eficientes con al menos un alelo funcional y metabolizadores ultrarrápidos con una actividad enzimática excesiva debido a la presencia de múltiples (3-13) copias de alelos funcionales como consecuencia de la duplicación génica. (Ver Tabla 2 del apartado Introducción de esta tesis doctoral).

En esta tesis doctoral hemos realizado el genotipado para CYP2D6 y CYP2C19 en 90 mujeres con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo utilizando para ello el Test Amplichip CYP450 (CE-IVD) de Roche que detecta 29 mutaciones de CYP2D6 y otras dos de CYP2C19, mayoritariamente de tipo SNP, así como algunas deleciones y

duplicaciones. Se basa en una amplificación de regiones específicas de dichos genes por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) a partir de ADN purificado procedente de sangre total. Posteriormente se lleva a cabo un fragmentado y rotulado de los productos amplificados así como una hibridación y tinción del microarray de Afimetrix. Tras una lectura óptica del microarray, el *software* de análisis de datos asociado genera un informe indicando no solo el genotipo del paciente sino también su fenotipo metabolizador (ultrarrápido, eficiente, intermedio o lento). (*Ver apartado Material y Métodos*).

La enzima CYP2D6 perteneciente al complejo citocromo P450 monooxigenasa participa en la biotransformación de un elevado número (en torno al 25%) de los fármacos prescritos con mayor frecuencia entre los que se encuentran antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, antieméticos, betabloqueantes, opioides o antagonistas de receptores estrogénicos como el Tamoxifeno, es por ello que la aplicación de esta tecnología analítica es de enorme interés para el facultativo en lo que se refiere a pacientes en tratamiento con fármacos metabolizados a través de este gen con objeto de individualizar la elección de la terapia y la dosis.

La distribución de alelos de CYP2D6 funcionales, de funcionalidad reducida y afuncionales presenta diferencias raciales y/o étnicas. (*Bjornsson et al., 2003; Solus et al., 2004; Sistonen et al., 2007; Teh & Bertilsson., 2011*). Los alelos de CYP2D6 funcionales son los predominantes en europeos caucásicos así como para los americanos de origen caucásico. Los alelos afuncionales están presentes en mayor medida entre los europeos caucásicos, presentando la menor frecuencia de aparición entre la población asiática. La frecuencia del fenotipo metabolizador ultrarrápido es máxima entre las poblaciones de Arabia Saudí y Etiopía. (*Ingelman-Sundberg., 1999*).

CYP2D6\*1 es el alelo normal que codifica para la enzima funcionalmente activa. Los alelos CYP2D6\*2, CYP2D6\*33 y CYP2D6\*35 contienen mutaciones puntuales que no afectan a las propiedades catalíticas del producto génico. En nuestro trabajo, realizado en mujeres con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo, hemos encontrado una frecuencia del 35% para el alelo \*1, un 21% para el alelo \*2 y un 6.7% en el alelo \*35, para un total de un 65% de alelos funcionales (a los que se ha sumado un porcentaje del 1.7% correspondiente a alelos con actividad enzimática aumentada como el \*1XN y el \*2XN), resultados coincidentes con otros estudios publicados para la población española en los que se encontraron un 71% de alelos funcionales (*Menoyo et al., 2006*), con la mediterránea con un 77.9% (*Fusselli et al., 2004*) y con la población europea de origen caucásico, en este caso con una frecuencia entre un 33-37% para el alelo \*1 y un 22-

33% para el alelo \*2 (Bradford LD., 2002; Sachse et al., 1997; Marez et al., 1997). En todos estos casos se toma como referencia la población general. La actividad incrementada es consecuencia de una duplicación/amplificación del número de copias del gen activo, habiéndose encontrado hasta 13 copias funcionales del mismo en un alelo. (Aklillu et al., 1996).

Las variantes alelicas relacionadas con una actividad enzimática nula suelen deberse tanto a SNPs como a la presencia de deleciones, codones stop o defectos de splicing, siendo algunas de las más frecuentes CYP2D6\*4 (15-21% en personas de origen caucásico) (Sachse et al., 1997) o CYP2D6\*5 (3-6% en diferentes poblaciones), (2-4% en caucásicos) (Sachse et al., 1997). Aproximadamente un 7% a 10% de las mujeres de raza blanca carecen de una actividad enzimática de CYP2D6.

En nuestro trabajo hemos encontrado un 5.6% de mujeres metabolizadoras lentas para CYP2D6. Para la población española se ha encontrado una frecuencia de "metabolizadoras lentas" de un 6% mientras que este porcentaje para Europa occidental oscila entre un 5 y un 10%. (Mulder et al., 2005). En todos los casos, nuestras "metabolizadoras lentas" han tenido un genotipo 4\*/4\*. En este sentido, nuestros resultados coinciden con otros publicados para la población española en la que se ha encontrado una frecuencia del 13.8% para el alelo \*4 (Menoyo et al., 2006) mientras que nosotros hemos recogido un 17.7%. En un trabajo publicado recientemente se encontraba una frecuencia del 15.9% para el alelo \*4 en mujeres de la zona de La Alpujarra en España. (Fernández-Santander et al., 2010). En la misma línea un trabajo publicado por Fusselli y colaboradores en el año 2004 encontraba un 15.8% del alelo \*4 en la población mediterránea integrada por individuos procedentes del sur de España, del País Vasco, de Cerdeña, de Italia central y alpina y de Siria. Concretamente en la población del sur de España se recogía un 17.65% para el alelo \*4. Igualmente, estos resultados concuerdan con otros obtenidos para la población germana en la que tal y como ocurre con la nuestra la gran mayoría de alelos inactivos se corresponden con el \*4 mientras que se observa una pequeña o nula presencia de los alelos \*5, \*7 y \*8. (Griese et al., 1998; Sachse et al., 1997). Respecto a otros alelos no funcionales para CYP2D6, nosotros solamente hemos encontrado un porcentaje 0.6% para el alelo \*5 mientras que en la población española, caucásica y alpujarreña los porcentajes fueron del 3.33%, entre un 2-7%, 1.9% respectivamente. (Menoyo et al., 2006; Bradford et al. 2002 Fernández-Santander et al., 2010). Cabe destacar que en nuestro estudio no se han encontrado los alelos \*3 y \*6 que

si fueron hallados para la población española con un 0.95% cada uno (*Menoyo et al., 2006*), en la población caucasiana con entre un 1-2% (*Bradford et al. 2002; Sachse et al., 1997; Marez et al., 1997*) y en la población alpujarreña solamente se encontró el alelo \*3 con un 0.9% (*Fernández-Santander et al., 2010*). En el trabajo de Fusselli y colaboradores del año 2004 si se encontraron estos alelos \*3 y \*6 con un 1.5% y un 0.6% respectivamente. Por último indicar que otros alelos afuncionales como el \*7, \*8, \*12, \*14, \*15 o \*21 no se han sido encontrados ni en nuestro trabajo ni en estos estudios de la población española, alpujarreña o mediterránea aunque si aparecen descritos para la población de origen caucasiano. En cualquier caso es importante recordar que nuestros datos se refieren a mujeres con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo mientras que los demás que hemos citado provienen de estudios realizados en la población general.

Las bases genéticas del fenotipo “metabolizador lento” están bien caracterizadas: CYP2D6 \*1 es el alelo normal, que codifica una enzima completamente activa. Los polimorfismos CYP2D6 \*4 (1846G>A) y CYP2D6 \*6 (1707T>del) se encuentran en la mayoría (más del 75%) de las pacientes con el fenotipo CYP2D6 “metabolizador lento”. (*Bradford LD., 2002; Sachse et al., 1997*). Como ya hemos indicado, en nuestro trabajo el 100% de los fenotipos "metabolizador lento" se corresponden con un genotipo 4\*/4\*. Otros alelos relacionados con una actividad metabólica reducida son, por ejemplo, CYP2D6\*10 alelo del que hemos obtenido una frecuencia del 3.9%, encontrándose en un 1.90% para la población española (*Menoyo et al., 2006*). (38-70% en asiáticos, 0.05% en caucasicos), CYP2D6\*17 del que hemos encontrado un 1.1% (20-34% en africanos) o CYP2D6\*9 obtenido en nuestro estudio en una frecuencia del 5 % (0-3% en caucasicos). En la población blanca, los alelos CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, CYP2D6\*5 y CYP2D6\*6 son los responsables del 97% de variantes enzimáticas no funcionantes para este gen. (*Gaedigk et al., 1997*). En el momento actual se han descrito más de 100 alelos diferentes quedando demostrada la enorme variabilidad interindividual existente para el gen CYP2D6. (*Fernández-Santander et al., 2007*).

De los resultados obtenidos con la medida de los niveles de tamoxifeno y sus metabolitos en sangre de las pacientes con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo en relación con el genotipo, se nos plantea considerar, en el futuro, en qué medida la terapia con tamoxifeno podría mejorarse, si estuviera guiada por el genotipo (*Lasch et al., 2009*) y de esa forma personalizar los tratamientos. Parece claro que las concentraciones séricas de tamoxifeno y sus metabolitos deberían alcanzar niveles

suficientes como para obtener el efecto terapéutico deseado. De cualquier forma y aunque los estudios epidemiológicos que asocian genotipo de CYP2D6 y recurrencia del cáncer de mama presentan resultados muy heterogéneos, se hace necesario incorporar, de forma cada vez más frecuente, el estudio de biomarcadores de CYP2D6 junto con el de niveles de tamoxifeno y sus metabolitos, en el interés de mejorar las estrategias de tratamiento en el futuro. Así lo creemos poner de manifiesto en nuestros resultados sobre concentraciones de tamoxifeno y sus metabolitos en los diferentes grupos de pacientes.

El mejor conocimiento de la farmacogenómica del tamoxifeno (Brauch et al., 2009) asociado a un mejor análisis del significado funcional de las variantes UDP-glucuronosil transferasa para el estudio de metabolitos activos del tamoxifeno, constituyen en este momento una línea de investigación muy prometedora ( Blevins-Primeau et al., 2009) para conocer los polimorfismos funcionales de UGTs al metabolizarse tamoxifeno y conocer la variabilidad interindividual en este metabolismo, así como clasificar la identificación de metabolitos, ya conocidos, como potencialmente genotóxicos (Lim CK. et al., 1997) o la formación de aductos de tamoxifeno-ADN (Kim SY. et al., 2005). Nuestros resultados también permiten aventurar la hipótesis acerca del grado de “compensación metabólica” que pueda existir ante diferentes genotipos metabolizadores.

En este sentido, debemos esperar grandes avances como resultado de las aplicaciones específicas de las técnicas de análisis primario de metabolitos mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas y otras variaciones analíticas, a fin de conocer con más detalle las concentraciones plasmáticas de metabolito activo, isómeros activos, en virtud de la variabilidad genética y la codificación de las enzimas de biotransformación y los factores ambientales. Así el endoxifeno 4-OH y sus isómeros que se mantienen estables más de seis meses en plasma congelado, constituyen la primera cuantificación sensible, específica, precisa y reproducible de tamoxifeno y los isómeros de sus metabolitos para el seguimiento de pacientes en tratamiento con tamoxifeno (Jaremko M. et al., 2010). En nuestro caso, hemos podido constatar la capacidad discriminatoria que puede tener la aplicación de LC/MS/MS. La toxicidad del tamoxifeno, especialmente la referida al riesgo de cáncer de endometrio y tromboembolismo pueden limitar el uso del fármaco, como agente reductor del riesgo de cáncer de mama. se hace necesario estratificar a las mujeres candidatas al tratamiento intentando objetivar, en lo posible, el riesgo-beneficio. Por lo tanto, desarrollar una estrategia

farmacogenética permitirá preseleccionar las variantes genotípicas CYP2D6 que determinan una actividad metabólica reducida. De la misma forma, el análisis de las diferentes rutas metabólicas que se dan en tamoxifeno, con el estudio de diferentes genes implicados, permitirá esclarecer las asociaciones farmacogenómicas que a su vez determinan la existencia de mujeres con un mayor riesgo y menor beneficio, dada la utilización preventiva de tamoxifeno (Dunn et al., 2010).

Por todo lo anterior, consideramos que el informe farmacogenético, previo al tratamiento con tamoxifeno, justifica la importancia que tiene conocer la variabilidad genética implicada en su metabolismo, correlacionada a la vez con los niveles de metabolitos. De esta forma podremos conocer de forma individualizada la presencia y grado de expresión de los genes implicados y por ende deducir posibles cambios estratégicos en el tratamiento con tamoxifeno.

A tenor de nuestros resultados, las concentraciones de Endoxifeno, N-Desmetiltamoxifeno y 4-OH-tamoxifeno pueden tener una significativa aplicabilidad clínica, mientras que los niveles de N-óxido de tamoxifeno pueden tener una importancia futura para la mejor interpretación de la relación dosis de tamoxifeno – respuesta clínica y su relación con efectos adversos.

Aunque deducimos en esta discusión que queda todavía mucho trabajo por realizar, aceptamos con la mayoría de los autores que el análisis y estudio farmacogenético del tamoxifeno, en un modelo muy adecuado y clarificador en su metodología, que a su vez se puede hacer extensivo a multitud de fármacos y protocolos terapéuticos, que permiten desarrollar el amplio concepto de la medicina personalizada con criterios de eficacia, reducción de efectos adversos y mejoras sustanciales en el coste-efectividad.



## **VI. CONCLUSIONES**

---

## VI. CONCLUSIONES.

- 1) Tras realizar el genotipado para CYP2D6 y CYP2C19 a 90 pacientes con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo se han encontrado los siguientes resultados: 72 pacientes con fenotipo metabolizador eficiente o extensivo, 11 con fenotipo metabolizador intermedio, 2 con fenotipo metabolizador ultrarrápido y 5 con fenotipo metabolizador lento o pobre que representan un 80.0%, 12.2%, 2.2% y 5.5% respectivamente del total de las 90 pacientes estudiadas.
- 2) Para el gen CYP2D6 se han encontrado 28 genotipos diferentes superando 7 de ellos el 5 %. Estos 7 genotipos son: \*1/\*1, \*1/\*2, \*1/\*4, \*1/\*35, \*2/\*2, \*2/\*4 y \*4/\*4 con unos porcentajes del 15.6, 14.5, 7.8, 6.7, 6.7, 6.7 y 5.6% respectivamente. Para este mismo gen se han encontrado 11 alelos diferentes superando 6 de ellos el 5%, concretamente los alelos 1, 2, 4, 35, 41 y 9 con unos porcentajes del 35.0, 21.0, 18.9, 6.7, 6.1 y 5.0 % respectivamente.
- 3) Para las metabolizadoras eficientes del gen CYP2D6 los genotipos mayoritarios han sido el \*1/\*1, \*1/\*2 y \*1/\*4 con un 19.44, 18.06 y 9.72% respectivamente, siendo los alelos mayoritarios el 1, 2 y 4. En el caso de las metabolizadoras intermedias el genotipo mayoritario ha sido el \*9/\*41 con un 27.2%. Todas las metabolizadoras lentas han tenido un genotipo \*4/\*4. Por último, las metabolizadoras ultrarrápidas, en numero de 2, han tenido 2 genotipos diferentes siendo los alelos mayoritarios el 1XN, 2 y 1 los tres con un porcentaje del 50%, 25% y 25% respectivamente.
- 4) En el genotipado del gen CYP2C19 se han encontrado tres genotipos distintos: \*1/\*1, \*1/\*2 y \*2/\*2 siendo el \*1/\*1 el mayoritario con más de un 71%. El alelo 1 alcanza un porcentaje del 84.4%.
- 5) La determinación de las concentraciones plasmáticas de Tamoxifeno y sus metabolitos, con especial relevancia para el endoxifeno, debido a su mayor actividad terapéutica, pone de manifiesto que las pacientes metabolizadoras lentas para CYP2D6 tienen, a dosis de 20 mg/día, unos niveles plasmáticos de Tamoxifeno y endoxifeno significativamente inferiores a los de las metabolizadoras intermedias, eficientes o ultrarrápidas, mientras que al aumentar

la dosis a 40 y a 60 mg/día los niveles plasmáticos se incrementan, y en el caso de dosis de 60 mg/día, hasta niveles similares a los del resto de las pacientes con fenotipo metabolizador normal. Por ello, resulta importante la determinación del genotipado para CYP2D6 en pacientes con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo en tratamiento con Tamoxifeno ya que casi un 6% de estas pacientes están siendo indebidamente tratadas.



## **VII. BIBLIOGRAFIA**

---

## VII. BIBLIOGRAFIA.

### A

- **Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M.** Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in a Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 441-446. 1996.
- **Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, Lecoche M, Metivier J, Booser D, Ibrahim N et al.** Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 22(12):2284-93.2004.

### B

- **Bardin A, Boule N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P.** Loss of ER beta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 11:537-5. 2004.
- **Barton DL, Loprinzi CL, Novotny P, Shanafelt T, Sloan J, Wahner-Roedler D, Rummans TA, Christensen B, Dakhil SR, Martin LS.** Pilot evaluation of citalopram for the relief of hot flashes. *J Support Oncol* 1(1): 47-51. 2003.
- **Blevins-Primeau A., Sun D., Chen G., Arun K., et al.** : Functional Significance of UDP-glucuronosyltransferase variants in the metabolism of active tamoxifen metabolites. *Cancer Res*. 2009, Vol. 69 (5): 1892-1900.
- **Brauch H., Mürdter TE., Eichelbaun M. & Schwab M:** Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clinical Chemistry* 2009, Vol. 55 (10): 1770-1782.

- **Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD.** CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci.* 96: 2224-2231. 2007.
- **Bjornsson, T.D., Wagner, J.A., Donahue, S.R., Harper, D., Karim, A., et al.** A review and assessment of potential sources of ethnic differences in drug responsiveness. *Journal of Clinical Pharmacology.* 43:943-967. 2003.
- **Blaisdell, J., Mohrenweiser, H., Jackson, J., Ferguson, S., Coulter, S., et al.** Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics.* 12:703-11. 2002.
- **Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff DM, Wu L, Hillman Grant, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA.** Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 80 (1): 61-74. 2006.
- **Borgna JL, Rochefort H.** Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *J Biol Chem* 256:859-868, 1981
- **Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM.** Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 39(12):1718-29. 2003.
- **Bradford, LD.** CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3:229-243. 2002.
- **Broly, F, Marez, D, Lo Giudice, JM, Sabbagh, N, Legrand, M, et al.** A nonsense mutation in the cytochrome P450 CYP2D6 gene identified in a Caucasian with an enzyme deficiency. *Human Genetics.* 96:601-3. 1995.
- **Broly, F., Meyer, U.A.** Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics.* 3:123-30. 1993.
- **Burstein HJ, Prestud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, et al.** American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 28(23):3784-96. 2010

C

- **Cai, W., Nikoloff, DM., Pan, RM., de Leon, J., Fanti, P., Fairchild, M., et al.** CYP2D6, genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: Implications for clinical practice and genetic testing. *The Pharmacogenomics Journal*. 1:1-8. 2006.
- **Candiotti, K., Birnbach, D., Lubarsky, D., Nhuch, F., Kamat, A., et al.** The Impact of Pharmacogenomics on Postoperative Nausea and Vomiting: Do CYP2D6 Allele Copy Number and Polymorphisms Affect the Success or Failure of Ondansetron Prophylaxis? *Anesthesiology*. 102:543-9. 2005.
- **Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, et al.** Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. Feb; 7(2):122-92. 2009.
- **Carpenter R, Miller WR.** Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer* 93:S1-S5. 2005.
- **Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutiérrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC et al.** Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 362(9381):362-369. 2003.
- **Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, Stefanick ML, Manson JE, Gass M, et al.** Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *N Engl J Med*. Feb 5; 360(6):573-87. 2009.
- **Clark GM.** Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30:17- 21. 2001.
- **Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y et al.** Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 22:7316-7339. 2003.
- **Clemons M, Goss P.** Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344:276. 2001.
- Clinical Pharmacology Subcommittee-Advisory Committee meeting, October 18, 2006; Acceso:<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder06.html#PharmScience>.

- **Coezy E, Borgna JL, and Rochefort H.** Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 4:317-23, 1982.
- **Constanza ME.** Epidemiology and risk factors for breast cancer. Up To Date. 2004. (Version electronica).
- **Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T et al.** Intergroup exemestane study. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 350: 1081-1092. 2004.
- **Cuzick J, Forbes JF, Sestak I, Cawthorn S, Hamed H, Holli K, Howell A.** Long-term results of Tamoxifen Prophylaxis for breast cancer-96-month follow-up of the randomized IBIS-I Trial. *JNCI* 99 (4): 272-282. 2007.
- **Cuzick J, Sasieni P, Howell A.** Should aromatase inhibitors be used as initial adjuvant treatment or sequenced after tamoxifen? *Br J Cancer* 27; 94(4):460-4. 2006.
- **Cuzick J.** Aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *J. Clin. Oncol* 23(8): 1636-1643. 2005.

## D

- **Dahl, M.L, Johansson, I., Bertilsson, L., Ingelman-Sundberg, M., Sjoqvist, F.** Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274:516-20. 1995.
- **Daly, A.K.** Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 17:27-41. 2003.
- **De León J, Armstrong SC, Cozza KL.** Clinical Guidelines for Psychiatrists for the Use of Pharmacogenetic Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics* 47:75–85. 2006.

- **Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA.** Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 310(3): 1062-1075. 2004.
- **Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC.** Cancer de mama. Avances en diagnostico, tratamiento e investigación. J Diaz-Faes y A Rubial Ed. Fundacion de estudios mastologicos. Cap 5: 80-97. 2006.
- **Dunn BK., Greene MH., Kelley JM., Costantino JP., Clifford RJ. et al.:** Novel pathway analysis of genomic polymorphism-cancer risk interaction in the breast cancer prevention trial. *Int. J. Mol. Genet. Epidemiol.* 2010, Vol. 1 (4): 332-349.

## E

- **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687-1717, 2005.
- **Evans WE, McLeod HL.** Pharmacogenomics-drug disposition, drugs targets and side effects. *N. Engl. J. Med* 348(6): 538-549. 2003.
- **Evert, B., Griese, E.U., Eichelbaum, M.** Cloning and sequencing of a new non-functional CYP2D6 allele: deletion of T1795 in exon 3 generates a premature stop codon. *Pharmacogenetics* 4:271-4. 1994.

## F

- **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** GLOBOCAN 2002. Lyon, IARC Press. 2004.
- **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** GLOBOCAN 2002: cáncer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1.0. *IARC Cancer Base* n° 5. Lyon IARC Press 2001.
- **Fernández-Santander A, Tejerina-Gomez A, Tejerina-Bernal A, Gomez F, Santiago C, Bandres F.** Aspectos farmacogeneticos en el tratamiento del cáncer de mama con tamoxifeno. *Colección Docencia Universitaria. Fundación Tejerina.* 2007.
- **Fernández-Santander A, Luna F, Santiago C, Rodriguez MT, Bandres F, Ruiz JR, Lucia A, Gomez-Gallego F.** CYP2D6 polymorphism screening in a selected population of Spain (La Alpujarra): No effect of geographical isolation. *Annals of Human Biology* 37(2):267-273. 2010.
- **Fisher D, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM et al.** Tamoxifen for prevention of breast cancer : report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl. Cancer Insts* 90: 1371-88. 1998.
- **Flórez J, Armijo J.A, Mediavilla A.** Farmacología Humana. 4ª Edición. Masson. Cap 50:893-97. 2003.
- **Fusselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruziani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G.** Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *European Journal of Human Genetics* 12, 916-924. 2004.

G

- **Gaedigk, A, Bradford, LD, Marcucci, KA, Leeder, JS.** Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 72:76-89. 2002.
- **Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS.** Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 9(6): 669-82. 1997.
- **Gaedigk, A., Ndjountche, L., Divakaran, K., Bradford, LD., et al.** Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: Characterization of gene duplication events. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 81: 242-51. 2007.
- **Gaedigk, A., Ryder, D.L., Bradford, L.D., and Leeder, J.S.** CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584G promoter polymorphism. *Clinical Chemistry.* 49:1008-11. 2003.
- **Gallacchi P, Schoumacher F, Eppenberger-Castori et al.** Increase expression of estrogen-receptor exon 5-deletion variant in relapse tissues of human breast cancer. *In J cancer* 79 (1): 74-78. 1998.
- **Garcia-Barcelo, M., Chow, L.Y., Lam, K.L., Chiu, H.F., Wing, Y.K., et al.** Occurrence of CYP2D6 gene duplication in Hong Kong Chinese. *Clinical Chemistry.* 46:1411-3. 2000.
- **Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM et al.** The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 101(1): 113-21. 2007.
- **Goetz MP, Rae JM, Suman VJ et al.** Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation in associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 23(36): 9312-9318. 2005.
- **Goldstein JA.** Clinical relevance of genetics polymorphism in the human CYP2C subfamily. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52:349-355. 2001.

- **Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Picart MJ et al.** A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early stage breast cancer. *N Engl J Med* 349: 1793-1802. 2003.
- **Gough, A.C., Miles, J.S., Spurr, N.K., Moss, J.E., Gaedigk, A., et al.** Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*. 347:773-6. 1990.
- **Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P.** Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v erb A. *Nature*, 320:134. 1986.
- **Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G et al.** Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8:15-26. 1998.

## H

- **Hanioka, N., Kimura, S., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J.** The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *American Journal of Human Genetics* 47:994-1001. 1990.
- **Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG.** Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol*. 150(3):243-55. 2004.
- **Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS.** The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends. Genet* 13(1): 27-33. 1997.

## I

- **Ibeanu, G.C., Goldstein, J.A., Meyer, U., Benhamou, S., Bouchardy, C., et al.** Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19\*6 and CYP2C19\*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286:1490-5. 1998.

- **Ingelman-Sundberg, M.** Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. *Drug Metabolism Reviews*. 31:449-459. 1999.
- **Ishiguro, A., Kubota, T., Ishikawa, H., Iga, T.** Metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in healthy Japanese volunteers carrying duplicated CYP2D6 genes: duplicated allele of CYP2D6\*10 does not increase CYP2D6 metabolic activity. *Clinica Chimica Acta*. 344:201-4. 2004.

## J

- **Jaremko M., Kasai Y., Barginear MF., Raptis G., Desnick RJ. & Yu C:** Tamoxifen metabolite isomer separation and quantification by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, Vol. 82: 10186-10193.
- **Ji, L., Pan, S., Marti-Jaun, J., Hanseler, E., Rentsch, K., et al.** Single-step assays to analyze CYP2D6 gene polymorphisms in Asians: allele frequencies and a novel \*14B allele in mainland Chinese. *Clinical Chemistry*. 48:983-8. 2002.
- **Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho W, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler S, Weinshilboum RM, Rae JM, Hayes DF, Flockart DA.** CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 97: 8009-8016. 2005.
- **Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L et al.** Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res* 65(17): 8009-8016. 2005.
- **Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F., et al.** Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90:11825-11829. 1993.

- **Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q.Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F., et al.** Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Molecular Pharmacology*. 46:452-9. 1994.
- **Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G.** A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antiestrogenic activity. *J Endocrinol* 75 (2): 305-316. 1977.

## K

- **Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeugin, T., Meyer, U.A.** Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *Journal of Biological Chemistry*. 265:17209-14. 1990.
- **Kaiser R, Sezer O, Papiés A, Bauer S, Schelenz C, Tremblay PB, Possinger K, Roots I, Brockmoller J.** Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes. *J Clin Oncol* 20: 2805-2811. 2002.
- **Katzenellenbogen BS, Frasor J.** Therapeutic targeting in the estrogen receptor hormonal pathway. *Semin Oncol*. 31(1 Suppl 3):28-38. 2004.
- **Kim SY., Laxmi YRS., Suzuki N., Ogura K., Watabe T., et al.:** Formation of tamoxifen-DNA adducts via o-sulfonation, not o-acetylation, of  $\alpha$ -hydroxytamoxifen in rat and human livers. *Drug Metabolism Disposition* 2005, Vol. 33 (11): 1673-1678.
- **Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J.** The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *American Journal of Human Genetics*. 45:889-904. 1989.
- **Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, et al.** Impact of CYP2D6\*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci* 99(5):995-99. 2008.

- **Kuiper GG, Enmark E, Haggblad J, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.** Cloning of a novel estrogen receptor in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*.

## L

- **Lammers LA, Mathijssen RH, van Gelder T, Bijl MJ, de Graan AJ, Seynaeve C, et al.** The impact of CYP2D6-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 110 (6): 765-71. 2010.
- **Lasch T., Emst Un Lien, Sorensen HT., Hamilton-Dutoit S.:** Genotype-guided tamoxifen therapy: time to pause for reflection? *The Lancet Oncology* 2009, Vol. 10 (8): 825-833.
- **Leathart, J.B., London, S.J., Steward, A., Adams, J.D., Idle, J.R., et al.** CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*. 8:529-41. 1998.
- **De Leon J, Armstrong SC, Cozza KL.** Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics* 47(1): 75-85. 2006.
- **Lien EA, Anker G, Ueland PM.** Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55 (2): 229-35. 2005.
- **Lim CK., Yuan ZX., Jones RM., White INH. & Smith LL:** Identification and mechanism of formation of potentially genotoxic metabolites of tamoxifen: study by LC-MS/MS. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997, Vol. 15: 1335-1342.
- **Lovlie, R., Daly, A.K., Idle, J.R., Steen, V.M.** Characterization of the 16+9 kb and 30+9 kb CYP2D6 XbaI haplotypes. *Pharmacogenetics*. 7:149-52.1997.
- **Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L.** Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128. 1990.

## M

- **Marez, D., Legrand, M., Sabbagh, N., Guidice, J.M., Spire, C., et al.** Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*. 7:193-202. 1997.
- **Marez, D., Sabbagh, N., Legrand, M., Lo-Guidice, J.M., Boone, P., et al.** A novel CYP2D6 allele with an abolished splice recognition site associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*. 5:305-11. 1995.
- **Marez-Allorge, D., Ellis, S.W., Lo Guidice, J.M., Tucker, G.T., Broly, F.** A rare G2061 insertion affecting the open reading frame of CYP2D6 and responsible for the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*. 9:393-6. 1999.
- **Marina Pollán, M<sup>a</sup> José García-Mendizabal, Beatriz Pérez-Gómez, Nuria Aragonés, Virginia Lope, Roberto Pastor, Rebeca Ramis, Pablo Fernández, Javier García-Pérez, Enrique Vidal, Elena Boldo, Sandra Pérdomo y Gonzalo López-Abente.** Situación epidemiológica del cáncer de mama en España. *Psicooncología* vol 4 num 2-3: 231-48. 2007.
- **Marsh S, McLeod HL.** Pharmacogenetics and oncology treatment for breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother* 8:119-127. 2007.
- **Masimirembwa, C., Persson, I., Bertilsson, L., Hasler, J., Ingelman-Sundberg, M.** A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 42:713-9. 1996.
- **Menoyo A, del Rio E, Baiget M.** Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct* 24 (5):381-5. 2006.
- **Michalets, E.L.** Update: Clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*. 18:84-112. 1998.
- **Mitsunaga, Y., Kubota, T., Ishiguro, A., Yamada, Y., Sasaki, H., et al.** Frequent occurrence of CYP2D6\*10 duplication allele in a Japanese population. *Mutation Research*. 505:83-5. 2002.

- **de Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Meyer, U.A., Nakamura, K, et al.** Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Molecular Pharmacology*. 46:594-8. 1994.
- **de Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U.A., et al.** The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *Journal of Biological Chemistry* 269: 15419-22. 1994.
- **Mulder H, Wilmink FW, Beumer TL, Tamminga WJ, Jedema JN, Egberts AC.** The association between cytochrome P4502D6 genotype and prescription patterns of antipsychotic and antidepressant drugs in hospitalized psychiatric: A retrospective follow-up study. *J Clin Psychopharmacol* 25:188-191. 2005.

## N

- **Nabholtz JM, Gligorov J.** The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother*. 6: 1073-1094. 2005.
- **Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, J.C., Johnson, E.F., Kemper, B. Levin W, Philips, J.R., Sato, R. & Waterman, M.R.** The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6, 1-11. 1987.
- **Newman WG, Hadfield KD, Latif A, Roberts SA, Shenton A, McHague C et al.** Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 14(18): 5913-18. 2008
- **Nishiyama T, Ogura K, Nakano H et al.** Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis and trans-4-hydroxytamoxifen by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem Pharmacol* 63 (6): 2084-2092. 2002.
- **Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, et al.** Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 91(3): 249-58. 2005.

## O

- **Ohnishi T, Ogawa Y Saibara T et al.** CYP17 polymorphism as a risk factor of tamoxifen-induced hepatic steatosis in breast cancer patients. *Oncol. Rep* 13 (3) 485-489. 2005.
- **Osborne CK.** Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Eng J Med* 399: 1609-1618. 1998.
- **Oscarson, M., Hidestrand, M., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M.** A combination of mutations in the CYP2D6\*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Molecular Pharmacology* 52:1034-40. 1997.

## P

- **Panserat, S., Mura, C., Gerard, N., Vincent-Viry, M., Galteau, M.M., et al.** DNA haplotypdependent differences in the amino acid sequence of debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6): evidence for two major allozymes in extensive metabolisers. *Human Genetics.* 94:401-6. 1994.
- **Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H.** Cancer Incidence in Five Continents, Volumes I to VIII. . Lyon, IARC Press.2005.
- **Pedraza V, Gomez-Capilla JA, Escaramis G, Gomez C, Torne P, Rivera JM, Gil A, Araque P, Olea N, Estivill X, Farez-Vidal ME.** Gene expression signatures in breast cáncer distinguish phenotype characteristics, histologic subtypes, and tumor invasiveness. *Cancer* 116 (2): 486-496. 2010.
- **Powles TJ, Ashley S, Tidy A, Smith TH, Dowsett M.** Twenty year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *JNCI* 99(4): 283-290. 2007.

## R

- **Raimundo, S., Fischer, J., Eichelbaum, M., Griese, E.U., Schwab, M., et al.** Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 10:577-81. 2000.
- **Raimundo, S., Toscano, C., Klein, K., Fischer, J., Griese, E.U., et al.** A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 76:128-38. 2004.
- **Raña P, Lamas LJ, Carracedo A.** Cancer de mama. Avances en diagnóstico, tratamiento e investigación. J Diaz-Faes y A Rubial Ed. Fundacion de estudios mastologicos. Cap 10. 151-162. 2006.
- **Richardson, T.H., Jung, F., Griffin, K.J., Wester, M., Raucy, J.L., et al.** A universal approach to the expression of human and rabbit cytochrome P450s of the 2C subfamily in Escherichia coli. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 323:87-96. 1995.
- **Risch N, Merikangas A.** The future of genetics studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517. 1996.
- **Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M.** Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25: 1679-1691. 2006.
- **Romkes, M., Faletto, M.B., Blaisdell, J.A., Raucy, J.L., Goldstein, JA.** Erratum in: *Biochemistry*. 1993 Feb 9;32(5):1390. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*. 30:3247-55. 1991.

## S

- **Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, et al.** Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60:284-295, 1997.

- **Sachse, C., Brockmoller, J., Hildebrand, M., Muller, K., Roots, I.** Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics*. 8:181-5. 1998.
- **Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. The EURO CARE Working Group.** EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 45(6):931-991. 2009.
- **Saxena, R., Shaw, G.L., Relling, M.V., Frame, J.N., Moir D.T., et al.** Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Human Molecular Genetics*. 3:923-6. 1994.
- **Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, et al.** Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 25(33): 5187-93. 2007.
- **Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S et al.** Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *Jama* 302:1429-36. 2009.
- **Sistonen, J., Sajantila, A., Lao, O., Corander, J., Barbujani, G., Fuselli, S.** CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics*. 2:93-101. 2007.
- **Smith IE, Dowsett M.** Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*; 348: 2431-2442. 2003.
- **Solus, J., Arietta, B., Harris, J., Sexton, D., Steward, J. et. Al.** Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics*. 5(7):895-931. 2004.
- **Stearns V, Johnson MD, Rae JM, et al.** Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 95:1758-1764, 2003.
- **Steen, V.M., Molven, A., Aarskog, N.K., Gulbrandsen, A.K.** Homologous unequal crossover involving a 2.8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Human Molecular Genetics* 4:2251-7. 1995.

- **Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M et al.** The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336 (220):1401-08. 1997.

## T

- **Teh LK, Bertilsson L.** Pharmacogenomics of CYP2D6: Molecular Genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab. Pharmacokinet* 27: 55-67. 2012.
- **Thomas HV, Reeves GK, Key TJ.** Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control* 8 (6) 922-28. 1997.
- **Tucker AN, Tkaczuk KA, Lewis LM et al.** Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Let* 217 (1): 61-72. 2005.
- **Tyndale, R., Aoyama, T., Broly, F., Matsunaga, T., Inaba, T., et al.** Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*. 1:26-32. 1991.

## V

- **Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrembacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman et al.** Effects of tamoxifen vs raloxifen on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. The NSABP study of tamoxifen and raloxifen (STAR) P-2 trial. *JAMA* 295:2727-2743. 2006.

## W

- **Wang, S.** Phenotypes and genotypes of debrisoquine hydroxylation polymorphisms in Chinese, *Master's thesis*. National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan. 1992.
- **Wang, S.L., Lai, M.D., and Huang, J.D.** G169R mutation diminishes the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese. *Drug Metabolism and Disposition*. 27:3:385-88. 1999.
- **Watters JW, McLeod HL.** Recent advances in the pharmacogenetics of cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4(6):565-571. 2002.
- **Wegman P, Vainikka L, Stal O et al.** Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 7: R284-R290. 2005.
- **Wegman P, Elingarami S, Cartensen J, Stal O, Nordenskjold B, Wingren S.** Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 9(1): R7. 2007.
- **Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC.** The tamoxifen metabolite, endoxifeno, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 1722-7. 2009.

## Y

- **Yokota, H., Tamura, S., Furuya, H., Kimura, S., Watanabe, M., et al.** Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics*. 3:256-63. 1993.

**Z**

- **Zhao Z, Boerwinkle E.** Neighboring nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome. *Genome Res* 12: 1679-1686. 2002.