



# ESTRATEGIA DE GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN CYP2D6 POR PCR DE LARGA DISTANCIA Y SECUENCIACIÓN

## AUTORES:

M. Del Federico, A. Seravalle, M.S. Baquedano, F. Fay.  
CIBIC. Centro de Diagnóstico Médico de Alta Complejidad, Rosario, Santa Fe. Argentina. sbaquedano@cibic.com.ar

## INTRODUCCIÓN:

Las diferencias en el metabolismo de drogas pueden conducir a severa toxicidad o falla terapéutica. El citocromo P450 2D6 (CYP2D6) interviene en el metabolismo de alrededor del 20% de las drogas actualmente prescritas. El gen CYP2D6 es extremadamente polimórfico y abarca nueve exones y ocho intrones formando parte del cluster CYP2D en el cromosoma 22 junto con dos pseudogenes CYP2D7 y CYP2D8. Los polimorfismos en el gen CYP2D6 dan lugar a distintos fenotipos: los metabolizadores rápidos (normales) poseen 2 alelos con función normal, los metabolizadores intermedios poseen una copia del gen activo y una copia de un alelo no funcional o con actividad enzimática reducida, mientras que los metabolizadores lentos poseen ambos alelos no funcionales. Los metabolizadores ultrarrápidos tienen múltiples copias de alelos funcionales. Existen más de 150 alelos del gen CYP2D6 cuyas frecuencias varían en función de la raza y la etnicidad. La determinación de las frecuencias alélicas en poblaciones específicas es de suma importancia para la aplicación en el ámbito clínico

## OBJETIVO:

Desarrollar un método de genotipificación del gen CYP2D6 con el fin de identificar los alelos presentes en la población argentina.

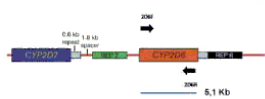
## MATERIALES Y MÉTODOS:

**MUESTRAS:** muestras de DNA almacenadas en el Laboratorio CIBIC en forma anónima no ligada ni rastreada. Para la validación del ensayo de detección de deleciones y duplicaciones génicas se utilizaron muestras de genotipo conocido (CYP2D6\*4/\*2x2, CYP2D6\*5/\*2x2, CYP2D6\*5/\*5, CYP2D6\*1/\*5) cedidas por la Dra. Kathrin Klein, Universidad de Tuebingen, Alemania.

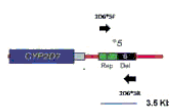
**EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS:** El ADN genómico se extrajo mediante el kit Master Pure DNA purification kit (EPICENTRE Biotechnologies) según las recomendaciones del fabricante.

**PCR Y SECUENCIACIÓN:** Se desarrolló una estrategia metodológica en dos etapas. La primera etapa consistió en PCRs de larga distancia para la evaluación de deleciones y duplicaciones génicas y la amplificación del gen completo CYP2D6 del cluster génico CYP2D, evitando la contaminación con los dos pseudogenes altamente homólogos. En la segunda etapa, los individuos con una o más copias de CYP2D6 fueron genotipificados por secuenciación. Cada exon fue amplificado en una segunda ronda de PCR y secuenciado utilizando los mismos oligonucleótidos cebadores.

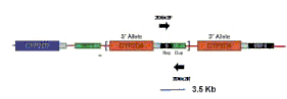
Esquema de PCR de larga distancia para amplificación del gen CYP2D6 completo (PCR-L CYP2D6) (1)



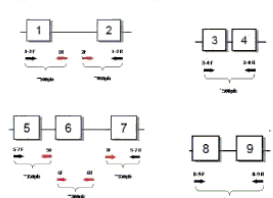
Esquema de PCR de larga distancia para detección de deleción génica (PCR-L del) (1)



Esquema de PCR de larga distancia para detección de duplicación génica (PCR-L dup) (2)

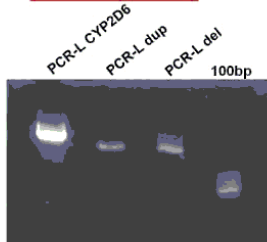


Secuenciación de todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes

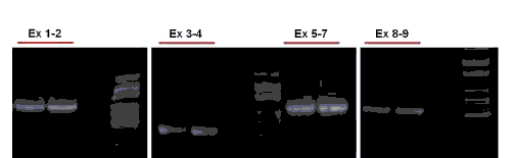


RESULTADOS / PCR LARGA DISTANCIA

CYP2D6\*5/\*2x2

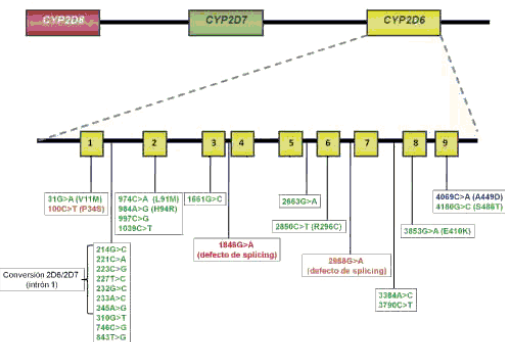


PCR NESTED



**GENOTIPIFICACIÓN:** A la fecha se genotipificaron un total de 17 muestras provenientes de sujetos argentinos no identificados.

Se identificaron 26 variantes de un único nucleótido, todas previamente descritas; y duplicación o multiplicación génica (CYP2D6\*1xN) en 2/34 alelos. Las variantes deletéreas 100C>T, 1846G>A y 2988G>A fueron halladas en 10/34, 10/34 y 2/34 alelos, respectivamente. Los alelos caracterizados hasta el momento derivan de 5 alelos principales, el alelo wild type CYP2D6\*1, los alelos funcionales CYP2D6\*2 y CYP2D6\*35, el alelo no funcional CYP2D6\*4 y el alelo con actividad reducida CYP2D6\*41 con una frecuencia de 16/34, 4/34, 2/34, 10/34 y 2/34, respectivamente. No se hallaron deleciones del gen CYP2D6.



Referencia:  
proteína con actividad nula  
actividad probablemente alterada (estudio in silico)  
actividad reducida  
actividad normal

## CONCLUSIÓN:

Se desarrolló y optimizó un método confiable y robusto de genotipificación del gen CYP2D6 por PCR de larga distancia y secuenciación. Dada la emergente práctica de la medicina personalizada, su aplicación permitirá identificar cuáles son los alelos más frecuentes en nuestra población con el fin de evaluar el desarrollo de un test de screening rápido y costo-efectivo de los principales alelos de CYP2D6 asociados con actividad reducida o inactivos.